

Strukturelle Untersuchungen an dem Radikalenzym (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
an der Universität Bayreuth

Vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Stefan Heiko Knauer

Bayreuth, 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2007 bis Mai 2011 unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Dobbek in der Arbeitsgruppe Bioanorganische Chemie an der Universität Bayreuth und in der Abteilung Biochemie / Strukturbiologie an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 04. Mai 2011
Wissenschaftliches Kolloquium: 15. Dezember 2011

Amtierende Dekanin:
Prof. Dr. Beate Lohnert

Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. Holger Dobbek (Erstgutachter)
Prof. Dr. Paul Rösch (Zweitgutachter)
Prof. Dr. Matthias Ullmann (Vorsitz)
Prof. Dr. Olaf Stemmann

„The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.“

Sir William Lawrence Bragg

„Das größte Hindernis auf dem Weg zur Erkenntnis ist nicht die Dummheit, es ist die Illusion des Wissens.“

Daniel J. Boorstin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	V
Summary	VII
1 Einleitung	1
1.1 Fermentation von proteinogenen Aminosäuren zur Energiegewinnung.....	1
1.2 Radikalenzyme	4
1.3 Die Familie der (<i>R</i>)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen	6
1.3.1 Der Aktivator und der Aktivierungsmechanismus.....	8
1.3.2 Die Dehydratase und die Bildung von Ketylradikalen.....	11
1.3.3 Die (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase	13
1.4 Dehydratasen mit Eisen-Schwefel-Zentren.....	14
1.4.1 Aconitase.....	15
1.4.2 Die bakterielle L-Serin-Dehydratase.....	16
1.5 Die (<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase.....	16
2 Ziele.....	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Anoxisches Arbeiten	21
3.2 Chemikalien, Biochemikalien, Materialien und Geräte	21
3.3 Bakterienstämme.....	21
3.4 Rekombinante Plasmide	22
3.5 Elektrotransformation.....	22
3.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung	23
3.8 Alignments von Aminosäuresequenzen	23
3.9 Die (<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase.....	23
3.9.1 Genexpression	23
3.9.2 Proteinreinigung	24
3.9.3 Analytische Gelfiltration	25
3.9.4 Kristallisation	25

3.9.5	Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse.....	26
3.10	Aktivator der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase.....	27
3.10.1	Genexpression	27
3.10.2	Proteinreinigung	28
3.10.3	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Oxidation und Reduktion	29
3.10.4	Kristallisation	30
3.10.5	Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse.....	32
3.10.6	Bestimmung des Redoxzustandes des Aktivators im Kristall.....	33
3.11	Dehydratase der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase	34
3.11.1	Genexpression	34
3.11.2	Proteinreinigung	34
3.11.3	UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Dehydratase.....	35
3.11.4	Rekonstitution	35
3.11.5	Synthese von (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA	35
3.11.6	Aktivitätsmessung	36
3.11.7	Reduktion der Dehydratase	36
3.11.8	Kristallisation	37
3.11.9	Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse.....	37
3.12	Komplexbildung des Aktivators und der Dehydratase	41
3.12.1	Ansatz und Reinigung des Komplexes.....	41
3.12.2	Analytische Gelfiltration	42
3.12.3	Kristallisation	43
3.12.4	Datensammlung, Strukturlösung und Charakterisierung der Kristalle	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Die (<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase.....	45
4.1.1	Genexpression, Proteinreinigung und Charakterisierung.....	45
4.1.2	Die Struktur der CoA-Transferase	45
4.2	Der Aktivator der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase.....	47
4.2.1	Genexpression, Proteinreinigung und Charakterisierung.....	47

4.2.2	Oxidation und Reduktion des Aktivators	49
4.2.3	Kristallisation des Aktivators	49
4.2.4	Die Struktur des Aktivators mit gebundenem ADP	50
4.2.5	Die Struktur des Aktivators mit gebundenem ADPNP	58
4.2.6	Die Struktur des Aktivators ohne Nukleotid	60
4.3	Die Dehydratase der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase	62
4.3.1	Genexpression und Proteinreinigung	62
4.3.2	Biochemische Charakterisierung.....	62
4.3.3	Reduktion der Dehydratase	63
4.3.4	Der Komplex aus Dehydratase und Aktivator	64
4.3.5	Die Kristallisation der Dehydratase	65
4.3.6	Kristallisation des Komplexes und Charakterisierung der Kristalle	66
4.3.7	Die Struktur der Dehydratase	68
5	Diskussion	75
5.1	Die (<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase.....	75
5.1.1	Reinigung und Kristallisation der CoA-Transferase	75
5.1.2	Die Struktur der CoA-Transferase	75
5.2	Der Aktivator der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase.....	78
5.2.1	Proteinreinigung des Aktivators	78
5.2.2	Oxidation und Reduktion des Aktivators	78
5.2.3	Die Struktur des reduzierten Aktivators mit ADP	79
5.2.4	Strukturelle Folgen der Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums	81
5.2.5	Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen des reduzierten Aktivators	83
5.2.6	Vergleich des reduzierten Aktivators mit Vertretern der Actin-Faltungsfamilie	86
5.2.7	Der Aktivierungsprozess	91
5.2.8	ATP-Hydrolyse	95
5.2.9	Vergleich des Aktivators mit dem Eisen-Protein der Nitrogenase	96
5.2.10	Konservierte Aminosäuren und homologe Proteine	99
5.3	Die Dehydratase der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase	103
5.3.1	Reinigung und biochemische Charakterisierung.....	103

5.3.2	Reduktion der Dehydratase	104
5.3.3	Die Struktur der Dehydratase	105
5.3.4	Struktureller Vergleich der Dehydratase mit Aconitase und SAM-Radikalenzymen	109
5.3.5	Strukturbasierter Reaktionsmechanismus zur Bildung von Ketylradikalen	110
5.3.6	Die (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase als Modellsystem für phylogenetisch verwandte Enzyme	115
6	Abkürzungsverzeichnis	119
7	Referenzen	122
8	Publikationen	136
9	Anhang	137
9.1	Chemikalien, Biochemikalien und Materialien	137
9.1.1	Chemikalien	137
9.1.2	Enzyme und Proteine	138
9.1.3	Materialien	138
9.2	Geräteliste	138
9.3	Weitere Tabellen	140
10	Danksagung	143
11	Erklärung	145

Zusammenfassung

In der Natur werden viele chemisch schwierige Reaktionen von Radikalenzymen katalysiert. Die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase katalysiert die Dehydratisierung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA in der Fermentation von L-Leucin im humanpathogenen Bakterium *Clostridium difficile*. Im Gegensatz zu einer Vielzahl von Radikalenzymen, wie beispielsweise der Coenzym B₁₂-abhängigen bakteriellen Klasse II Ribonukleotid-Reduktase oder der *S*-Adenosylmethionin-abhängigen Biotin-Synthase, benötigt die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase keine komplexen Kofaktoren zur Erzeugung des katalytisch aktiven Radikals. Stattdessen verwendet sie ein einzelnes, hoch energetisches Elektron. Bei der Dehydratisierung – einer atypischen α/β -Eliminierung – werden reduktiv Ketylradikale im Substrat erzeugt. Die Dehydratase muss zunächst aktiviert werden, indem ein Aktivator, der ein [4Fe-4S]-Zentrum enthält, unter ATP-Hydrolyse ein Elektron auf die Dehydratase überträgt. Für den Aktivator werden im Laufe des Aktivierungsprozesses Nukleotid- und redox-abhängige Konformationsänderungen angenommen. Das hoch reaktive Elektron wird nach jedem Substratumsatz wieder auf die Dehydratase übertragen, so dass bis zu 10.000 Umsätze katalysiert werden können, bevor eine erneute Aktivierung notwendig ist. Die strukturelle Grundlage der Aktivierung sowie die Art und Weise, wie das aktive Elektron in der Dehydratase nach erfolgtem Umsatz wiedergewonnen und vor Verlust durch unspezifische Nebenreaktionen geschützt wird, ist unbekannt.

In dieser Arbeit konnte zunächst die Struktur der homodimeren (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase gelöst werden, die in der Fermentation von L-Leucin den zweimaligen Transfer eines Coenzym A-Moleküls katalysiert. Sie gehört zur Familie III der CoA-Transferasen und besitzt deren typische Faltung. Ein Aspartatrest im aktiven Zentrum ist wahrscheinlich an der Ausbildung von kovalenten Intermediaten beteiligt.

Es wurden die Strukturen des reduzierten Aktivators ohne Nukleotid, mit ADP und mit dem ATP-Analogon ADPNP bestimmt. Der homodimere Aktivator gehört zur Actin-Faltungsfamilie und die Monomere sind durch ein verbrückendes [4Fe-4S]-Zentrum miteinander verbunden. Jedes Monomer besteht aus zwei Domänen, die in Abwesenheit eines Nukleotids eine offene und in Gegenwart eines Nukleotids eine geschlossene Konformation einnehmen. Die Strukturen des reduzierten Aktivators mit gebundenem ADP und ADPNP zeigten keine signifikanten Konformationsunterschiede. Der Vergleich mit der Struktur eines oxidierten Aktivators ergab, dass auch die Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums offenbar keine strukturellen Änderungen zur Folge hat. Möglicherweise spiegeln die Strukturen, die alle mittels Röntgenkristallographie bestimmt wurden, jedoch nicht die konformationelle

Flexibilität in Lösung wider. Erstmals wurde die Komplexbildung zwischen dem Aktivator und der Dehydratase mittels ADPNP nachgewiesen. Die Strukturen des Aktivators legen nahe, dass die Komplexbildung über den Prozess der konformationellen Selektion geschieht. Die Struktur der Dehydratase zeigte, dass das heterodimere Protein zwei [4Fe-4S]-Zentren in einem Abstand von 12 Å beinhaltet. Jedes Fe/S-Zentrum ist von drei Cysteinresten und einem terminalen Liganden koordiniert. Das Fe/S-Zentrum in der α -Untereinheit ist Teil des aktiven Zentrums und besitzt in Abwesenheit von Substrat ein Hydroxydion/Wassermolekül als vierten Liganden. Das Substrat ersetzt diesen Liganden und koordiniert das Fe/S-Zentrum mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioestergruppe. Das [4Fe-4S]-Zentrum in der β -Untereinheit hat eine Sulfhydryl-/Sulfidogruppe als terminalen Liganden und fungiert als Speicher für das Elektron, wenn kein Substrat anwesend ist. Die Struktur der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase dient als Modell für die Familie der 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen und der Gruppe der phylogenetisch verwandten Benzoyl-CoA-Reduktasen.

Summary

In nature many chemically challenging reactions are catalyzed by radical enzymes. (*R*)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase catalyzes the dehydration of (*R*)-2-hydroxyisocaproyl-CoA during the fermentation of L-leucine in the human pathogenic bacterium *Clostridium difficile*. In contrast to other radical enzymes, such as coenzyme B₁₂-dependent bacterial class II ribonucleotide reductase or *S*-adenosylmethionine-dependent biotin synthase, (*R*)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase requires no complex cofactors for radical generation, but uses a single high-energy electron instead. During the dehydration reaction – an atypical α/β -elimination – ketyl radicals are generated reductively on the substrate. First, a [4Fe-4S] cluster containing activator must activate the dehydratase by transferring an electron to the dehydratase concomitant with the hydrolysis of ATP. Nucleotide- and redox-dependent conformational changes of the activator during the activation process are assumed. After each turnover the highly reactive electron is recycled back to the dehydratase allowing up to 10,000 turnovers before a new activation is necessary. The structural basis for the activation process as well as for the recycling of the electron in the dehydratase and for the mechanism of how the loss of the active electron by unspecific side reactions is prevented in the dehydratase is unknown.

In this work, the structure of the (*E*)-2-isocaprenoyl-CoA:2-hydroxyisocaproate CoA transferase was solved. This enzyme catalyzes the transfer of a coenzyme A molecule twice in the fermentation pathway of L-leucine. The homodimeric transferase belongs to the family III of CoA transferases and an aspartate residue in the active site is probably involved in catalysis by forming covalent intermediates.

The crystal structures of the reduced activator without nucleotide, with ADP and with the ATP analog ADPNP were determined. The homodimeric activator is a member of the actin fold family and the monomers are connected via a bridging [4Fe-4S] cluster. Each monomer is composed of two domains, which adopt an open conformation in the absence of a nucleotide and a closed conformation when a nucleotide is present. The exchange of ADP by ADPNP does not lead to significant conformational changes. A comparison with an oxidized activator revealed that reduction of the Fe/S cluster has also no structural consequences. However, it is possible that the crystal structures do not reflect the conformational flexibility in solution. For the first time, complex formation between activator and dehydratase was observed in the presence of ADPNP. The crystal structures indicate that complex formation probably proceeds via a process called conformational sampling.

The structure of the dehydratase reveals that the heterodimeric protein harbors two [4Fe-4S]

clusters at a distance of 12 Å. Each cluster is coordinated by three cysteine residues and a terminal ligand. The Fe/S cluster in the α -subunit is part of the active site and has a hydroxide ion or water molecule as fourth ligand in the absence of substrate. When substrate enters the active site it replaces the water ligand and coordinates the Fe/S cluster via its carbonyl oxygen of the thioester. The [4Fe-4S] cluster in the β -subunit has a sulhydryl/sulfido group as the terminal ligand and serves as a storage for the electron in the absence of substrate, thus preventing unwanted side reactions. The structure of (*R*)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase is a model for the family of 2-hydroxyacyl-CoA dehydratases and the phylogenetically related benzoyl-CoA reductases

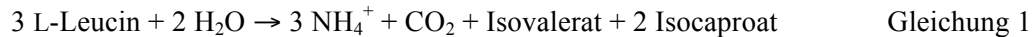
1 Einleitung

1.1 Fermentation von proteinogenen Aminosäuren zur Energiegewinnung

Viele chemotrophe Organismen können proteinogene α -Aminosäuren als Substrate in der Energiegewinnung nutzen (Barker, 1961; Garrity *et al.*, 2001; Jackins & Barker, 1951; Thauer *et al.*, 1977). Hierbei wandeln aerobe Organismen und atmende, anaerobe Organismen die α -Aminosäuren zunächst in die entsprechenden α -Oxosäuren um. Diese werden anschließend im Zitronensäure- / Krebs-Zyklus zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) oxidiert. Sind jedoch keine Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Sulfat oder Nitrat vorhanden, so sind nur einige wenige anaerobe Mikroorganismen in der Lage, α -Aminosäuren als Energiesubstrate zu nutzen, so beispielsweise Clostridien und Fusobakterien (Kim *et al.*, 2004). Diese fermentieren α -Aminosäuren zu kurzkettigen Fettsäuren, CO_2 , Ammoniak und molekularem Wasserstoff. Als Nebenprodukte entstehen Schwefelwasserstoff, Methanthiol, Phenole und Alkohole, die zusammen mit den Fettsäuren für den typischen Verwesungsgeruch verantwortlich sind.

Aminosäurefermentationen sind Redoxreaktionen, bei denen Aminosäuren als Elektronendonator und Elektronenakzeptor fungieren. In der berühmten Stickland-Reaktion (Stickland, 1934), die aus einem oxidativen und einem reduktiven Zweig besteht, werden zwei verschiedene Aminosäuren gekoppelt vergoren. Im oxidativen Teil erfolgt zunächst die Desaminierung einer Aminosäure zur entsprechenden α -Oxosäure, bevor diese durch Einbau von Coenzym A (CoA) zu einem "energiereichen" Thioester oxidativ decarboxyliert wird. Schließlich wird über Substratkettenphosphorylierung ATP gebildet. Die Kohlenstoffkette der resultierenden Fettsäure ist verglichen mit derjenigen der anfänglichen Aminosäure um ein Kohlenstoffatom kürzer. Im reduktiven Zweig wird die zweite Aminosäure reduktiv desaminiert, wodurch die im oxidativen Zweig benötigten Elektronenakzeptierenden Redoxäquivalente oxidiert und folglich regeneriert werden. Hierbei entsteht eine Fettsäure, die die gleiche Anzahl von Kohlenstoffatomen hat wie die ursprüngliche Aminosäure. Ein Beispiel hierfür ist die oxidative Decarboxylierung von Alanin zu Acetat bei gleichzeitiger Reduktion von Glycin zu Acetat in *Clostridium sporogenes* (*C. sporogenes*) (Stickland, 1934). Viele Clostridien nutzen Fermentationswege, bei denen eine einzige Aminosäure als Elektronendonator und Elektronenakzeptor dient (Barker, 1961). Die Fermentation von L-Leucin durch das humanpathogene Bakterium *Clostridium difficile* (*C. difficile*) kann hier als Beispiel aufgeführt werden (Bader *et al.*, 1982; Britz & Wilkinson, 1982; Dickert *et al.*, 2002). Insgesamt werden drei Mol Leucin vergoren, wobei zwei Mol zu

Isocaproat reduziert und ein Mol zu Isovalerat und CO₂ oxidiert werden (Britz & Wilkinson, 1982; Elsdén & Hilton, 1978) (Gleichung 1, Abbildung 1-1):



Die gewonnene Energie beträgt 146 kJ pro Reaktion, was circa 1,75 Mol Adenosin-5'-triphosphat (ATP) entspricht (Thauer *et al.*, 1977). Im reduktiven Zweig wird L-Leucin zunächst in (R)-2-Hydroxyisocaproat umgewandelt. Der Transfer von CoAS⁻ von einem Acyl-CoA-Molekül auf (R)-2-Hydroxyisocaproat liefert (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA (Kim *et al.*, 2006). Hierauf folgt die *syn*-Eliminierung von Wasser, wodurch (E)-2-Isocaprenoyl-CoA gebildet wird, bevor nach der Reduktion der Doppelbindung ein zweiter CoA-Transfer zur Freisetzung von Isocaproat führt (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

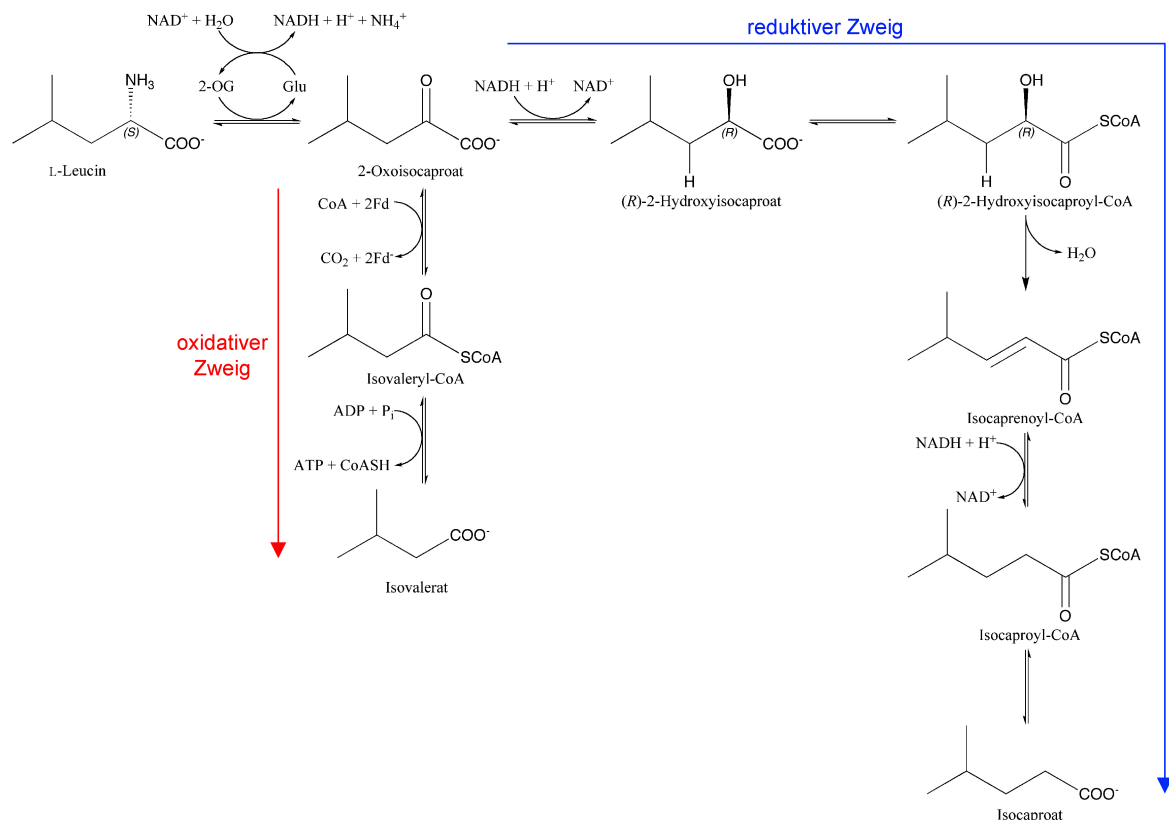


Abbildung 1-1: Vorgeschlagener Fermentationsweg von L-Leucin bei *C. difficile*. Verändert nach (Kim *et al.*, 2005).

Ein weiteres Beispiel ist die Fermentation von Glutamat in *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) und *Acidaminococcus fermentans* (*A. fermentans*). Hierbei wird Glutamat in Crotonyl-CoA umgewandelt, das anschließend zu Acetat oxidiert und zu Butyrat reduziert wird (Buckel, 2001).

Generell sind die oxidativen Zweige ähnlich zu Reaktionswegen, die auch bei atmenden Organismen gefunden werden. Im Gegensatz hierzu sind die reduktiven Äste der Stickland-

Reaktion und die Umwandlung von einzelnen Aminosäuren in Intermediate, die Redoxreaktionen eingehen können, meist einzigartig (Kim *et al.*, 2004). α,β -ungesättigte Acyl-CoAs (Enoyl-CoAs) sind ideale Intermediate, da sie Redoxreaktionen eingehen können: sie können β -oxidiert und reduziert werden. Um von der α -Aminosäure zu Enoyl-CoA zu gelangen, muss von der Aminosäure die Aminogruppe an der α -Position zusammen mit dem Wasserstoffatom am β -Kohlenstoffatom (β -Wasserstoffatom) abgespalten werden. Der direkte Weg wäre die β -Eliminierung der α -Aminosäure. α -Aminosäuren sind jedoch gegenüber β -Eliminierung resistent, da das β -Wasserstoffatom nicht azid/aktiviert ist und sein pK_a -Wert mit 40-50 zu hoch für einen basischen Rest in einem Enzym ist. Ausnahmen hiervon sind nur Aspartat, das sowohl als α - als auch als β -Aminosäure betrachtet werden kann, sowie Histidin und Phenylalanin. Deshalb ist ein aufwändiger Mechanismus notwendig, wie am Beispiel der Fermentation von L-Leucin ersichtlich ist. Die Aminosäuren werden zunächst in die entsprechende (*R*)-2-Hydroxysäure umgewandelt, bevor CoA auf sie übertragen wird. Das resultierende (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Intermediat wird im Folgenden zu Enoyl-CoA dehydratisiert, das schließlich in eine Fettsäure umgewandelt wird. Bis zu zwölf der 20 proteinogenen Aminosäuren können durch verschiedene strikt anaerobe Mikroorganismen im menschlichen Darm mittels solch einem (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Intermediat reduziert werden (Abbildung 1-2). Die acht verbleibenden proteinogenen Aminosäuren werden über Fermentationsmechanismen vergoren, bei denen (*R*)-2-Hydroxysäuren keine Rolle spielen (Kim *et al.*, 2004).

In den meisten Fällen werden (*R*)-2-Hydroxysäuren erzeugt, indem die Aminogruppe der α -Aminosäure auf 2-Oxoglutarat übertragen wird, bevor eine NADH-abhängige Reduktion erfolgt. Die Umwandlung der (*R*)-2-Hydroxysäuren in die CoA-Derivate wird von spezifischen CoA-Transferasen katalysiert.

Die interessantesten Enzyme in diesen Fermentationswegen sind die 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen, die die Dehydratisierung von (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA zu (*E*)-2-Enoyl-CoA katalysieren. In jedem der Reaktionswege ist dies der chemisch schwierigste Schritt, da das β -Wasserstoffatom wie bereits in der ursprünglichen Aminosäure nicht aktiviert ist. Die (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen katalysieren die Dehydratisierung deshalb mittels eines Radikalmechanismus und gehören folglich zu den Radikalenzymen.

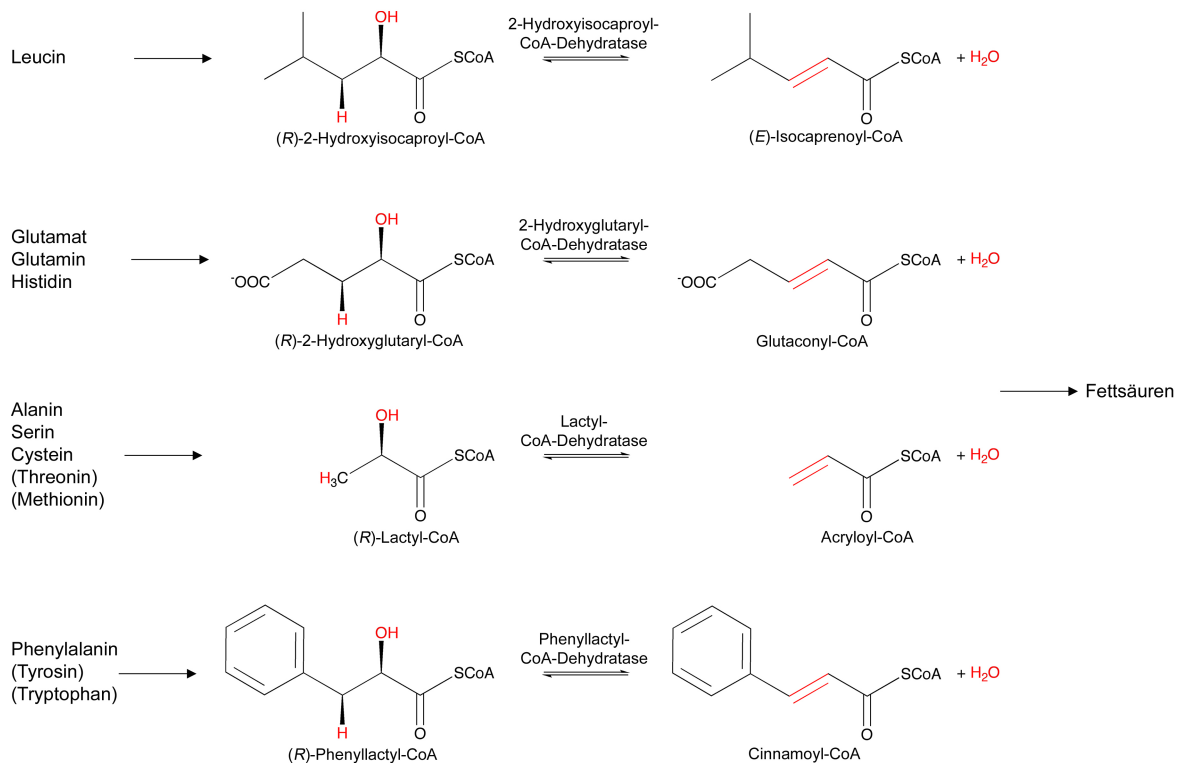


Abbildung 1-2: Reduktion von proteinogenen Aminosäuren zu Fettsäuren durch Dehydratisierung der entsprechenden (R) -2-Hydroxyacyl-CoA-Intermediate. Threonin und Methionin werden in (R) -2-Hydroxybutyryl-CoA umgewandelt, das von der Lactyl-CoA-Dehydratase zu Crotonyl-CoA dehydratisiert wird. Tyrosin und Tryptophan werden in 3-Aryllactyl-CoA konvertiert, aus dem von der Phenyllactyl-CoA-Dehydratase Wasser eliminiert wird, was zu Arylacryloyl-CoA führt. Verändert nach (Kim *et al.*, 2004).

1.2 Radikalenzyme

1939 schlug Leonor Michaelis erstmals vor, dass viele enzymatische Reaktionen Ein-Elektronen-Schritte beinhalten (Michaelis, 1939). In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde allgemein noch angenommen, dass keine Reaktion, die als Zwei-Elektronen-Schritt formuliert werden kann, radikalisch verläuft. Durch die Entdeckung einer stetig wachsenden Zahl von Enzymen, die stabile Radikale enthalten oder radikalische Intermediate stabilisieren, ist diese Annahme jedoch überholt (Buckel & Golding, 2006; Buckel, 2009). Solche Enzyme werden folglich als Radikalenzyme bezeichnet. Die Ribonukleotid-Reduktase (RNR) aus aerob gewachsenen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen, die heute als Klasse I RNR bekannt ist, war das erste Radikalenzym, das entdeckt wurde (Reichard, 1995). Radikale sind durch ihr ungepaartes Elektron eine hoch reaktive Spezies, die versuchen, mit einem anderen einzelnen Elektron zu paaren, das entweder von einem anderen Radikal oder einer σ - bzw. π -Bindung

stammt. Katalytische Radikale sind entweder Radikale, die aus Kofaktoren wie Coenzym B₁₂ (Frey, 2001; Frey, 2001) oder S-Adenosylmethionin (SAM) (Frey *et al.*, 2008) erzeugt werden, oder Protein-Radikale (Stubbe, 1989), wie sie bei Glycyl-Radikalenzymen vorkommen. Da Radikale irreversibel mit Sauerstoff reagieren, kommt die Mehrheit dieser Enzyme in anaeroben Bakterien und Archaeen vor (Buckel & Golding, 2006). Ausnahmen sind jedoch einige Vertreter von Coenzym B₁₂- und SAM-abhängigen Radikalenzymen (Buckel & Golding, 2006).

Das gemeinsame Merkmal von Radikal-katalysierten Reaktionen ist, dass die Substrate dieser Enzyme nicht durch einen Säure-Base-Mechanismus aktiviert werden können. Zwar erfordert die Bildung von Radikalen hohe Energien, doch können Radikalenzyme die barrierefreie Reaktivität von Radikalen nutzen, um Reaktionen katalysieren zu können, die durch Zwei-Elektronen-Schritte nicht erreicht werden können. Darüber hinaus müssen an Radikalenzyme besondere mechanistische und strukturelle Anforderungen gestellt werden, da die Erzeugung, die Speicherung und die Reaktion der Ein-Elektronen-Spezies streng kontrolliert werden muss, um "freie Radikale" zu vermeiden, die das Protein oder die Zelle schädigen würden (Buckel & Golding, 2006; Stubbe & van Der Donk, 1998).

Radikalenzyme werden basierend auf der Art der Radikalerzeugung und der involvierten Kofaktoren klassifiziert. Radikale können entweder durch Homolyse einer schwachen, kovalenten Bindung oder durch oxidativen bzw. reduktiven Ein-Elektronen-Transfer gebildet werden. Coenzym B₁₂-abhängige Radikalenzyme, wie z.B. die humane Methylmalonyl-CoA-Mutase (Banerjee & Vlasie, 2002) und die bakterielle Klasse II Ribonukleotid-Reduktase (Licht *et al.*, 1996), generieren das katalytische Radikal, indem sie die schwache Kohlenstoff-Cobalt-Bindung von Adenosylcobalamin (130 kJ/mol) homolytisch spalten, was zu Cob(II)alamin und dem katalytisch aktiven 5'-Desoxyadenosylradikal führt.

In einer stetig wachsende Gruppe von Radikalenzymen ersetzt der Kofaktor SAM das Coenzym B₁₂, um das gleiche 5'-Desoxyadenosylradikal zu erzeugen. Dies wird durch einen Ein-Elektronen-Transfer von einem Ferredoxin oder Flavodoxin auf das SAM-Radikalenzym und anschließende Spaltung der S-CH₂-Bindung des reduzierten SAM-Moleküls erreicht, wodurch Methionin und das 5'-Desoxyadenosylradikal entstehen. Da SAM verglichen mit Coenzym B₁₂ ein deutlich einfacheres Molekül ist, wurde es oft als "Adenosylcobalamin des armen Mannes" bezeichnet (Baker & Stadtman, 1982). Mittlerweile wird es aufgrund seiner Vielseitigkeit "Adenosylcobalamin des reichen Mannes" genannt (Frey & Magnusson, 2003). Das erzeugte 5'-Desoxyadenosylradikal abstrahiert entweder direkt ein Wasserstoffatom vom

Substrat oder aber von einem konservierten Glycinrest des Proteins, das hierdurch in das aktive Radikal verwandelt wird. Somit unterscheidet man die primären SAM-abhängigen Radikalenzyme, zu denen beispielsweise die Biotin-Synthase (Berkovitch *et al.*, 2004) und die Lysin-2,3-Aminomutase (Baraniak *et al.*, 1989) gehören, und die sekundären Glycyl-Radikalenzyme, für die die Pyruvat:Formiat-Lyase aus *E. coli* (Knappe & Wagner, 2001) ein Beispiel ist.

Auch Ein-Elektronen-Oxidation kann zur Erzeugung von Radikalen verwendet werden (Buckel & Golding, 2006). Ein Beispiel hierfür ist die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, bei der das Enolatanion des Substrates durch den Kofaktor Flavinadenindinukleotid (FAD) oxidiert wird (Martins *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Radikalenzymen stellen die (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen eine separate Familie dar (Buckel & Golding, 2006), da sie keinen komplexen Kofaktor wie Coenzym B₁₂ oder SAM zur Erzeugung des Radikals benötigen. Sie nutzen ein einzelnes, hoch energetisches Elektron, das nach jedem Umsatz wiedergewonnen wird, um durch Ein-Elektron-Reduktion im Substrat ein Ketylradikalanion zu generieren (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Ketylradikale eliminieren benachbarte Gruppen oder werden protoniert und bilden neutrale Radikale. Auch für die Benzoyl-CoA-Reduktasen, die phylogenetisch mit den (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen verwandt sind, wird angenommen, dass die Katalyse *via* Ketylradikalen verläuft (Boll *et al.*, 2002).

1.3 Die Familie der (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen

Die (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen katalysieren die β,α -Eliminierung von Wasser, weshalb sie als atypische Dehydratasen bezeichnet werden (Kim *et al.*, 2004). Um diese chemisch schwierige Reaktion bewerkstelligen zu können, verwenden sie einen Radikalmechanismus (Kim *et al.*, 2008). Bis heute wurden vier verschiedene 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen aus sechs Organismen charakterisiert:

- 1) Die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *C. difficile* (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010)
- 2) Die (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* (Dutschko *et al.*, 1989; Hans *et al.*, 2000; Hans *et al.*, 2002; Hans *et al.*, 2008; Muller & Buckel, 1995; Schweiger *et al.*, 1987), *Clostridium symbiosum* (*C. symbiosum*) (Hans *et al.*, 1999) und *F. nucleatum* (Klees *et al.*, 1992)
- 3) Phenyllactat-Dehydratase aus *C. sporogenes* (Dickert *et al.*, 2000; Dickert *et al.*, 2002)

- 4) Lactyl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium propionicum* (*C. propionicum*) (Hofmeister & Buckel, 1992; Kuchta & Abeles, 1985; Kuchta *et al.*, 1986; Schweiger & Buckel, 1984; Schweiger & Buckel, 1985)

All diese Dehydratasen bestehen aus zwei Komponenten, einem sehr sauerstoffempfindlichen Aktivator und der eigentlichen Dehydratase, die moderat sauerstoffempfindlich ist. Der Aktivator ist in allen Fällen ein Homodimer mit einem $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum zwischen den beiden Monomeren. Weiterhin handelt es sich beim Aktivator um eine ATPase und jedes Monomer weist eine ATP-Bindungsstelle auf (Locher *et al.*, 2001). Die Dehydratase liegt entweder als Heterodimer oder als Heterotrimer vor und enthält mindestens ein $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum.

Der Reaktionsmechanismus der Dehydratasen gliedert sich in zwei Teile (Abbildung 1-3). Zunächst reduziert ein Ferredoxin, das stärkste Reduktionsmittel in einer anaeroben Zelle, oder ein Flavodoxin das $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum des Aktivators zu einem $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Zentrum. Das Redoxpotenzial des $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ -Zentrums liegt bei circa -350 mV (Hans *et al.*, 2002; Thamer *et al.*, 2003).

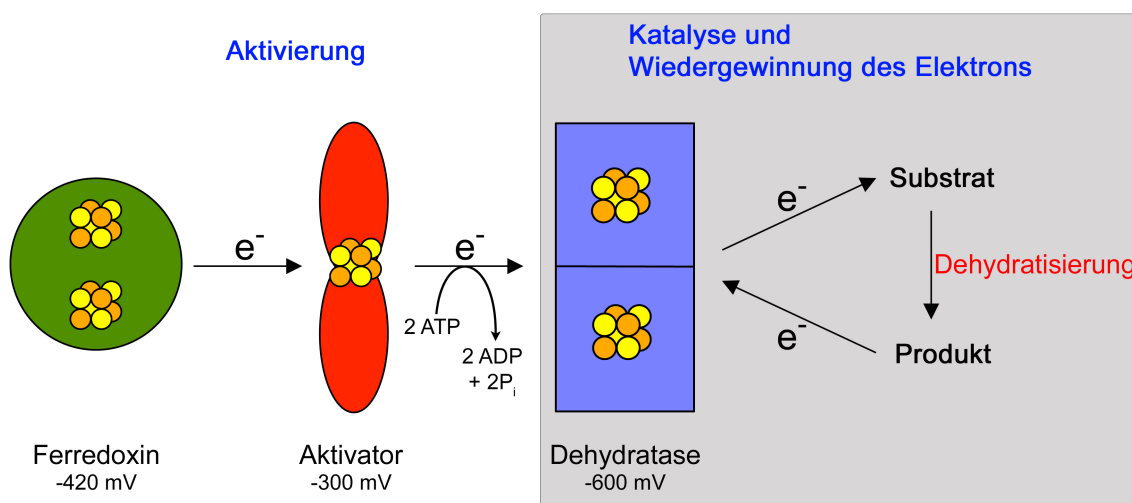


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Aktivierung, Katalyse und Wiedergewinnung des reaktiven Elektrons bei den (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen. Für die Proteine sind die ungefähren Redoxpotenziale (E_0') gegenüber der Standardwasserstoffelektrode angegeben.

Unter gleichzeitiger Hydrolyse von ATP überträgt der Aktivator nun das Elektron auf die Dehydratase und aktiviert diese (Hans *et al.*, 2002). Aufgrund des negativen Redoxpotenzials der Dehydratase ($\leq -600\text{ mV}$) (Kim *et al.*, 2005) ist eine direkte Elektronenübertragung vom Ferredoxin auf die Dehydratase unwahrscheinlich. Während der Dehydratisierung wird das hoch energetische Elektron auf das Substrat übertragen und nach erfolgter Wasserabspaltung auf die Dehydratase zurücktransferiert, so dass es für einen neuen Umsatz zur Verfügung

steht. Ist die Dehydratase aktiviert kann sie bis zu 10.000 Umsätze katalysieren, bevor eine erneute Aktivierung erforderlich ist (Kim *et al.*, 2005).

1.3.1 Der Aktivator und der Aktivierungsmechanismus

Bei den charakterisierten Aktivatoren handelt es sich um Homodimere mit einem Molekulargewicht von circa 60 kDa, die alle geringe ATPase-Aktivität besitzen (Kim *et al.*, 2004). Von der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* konnte die bislang einzige Struktur eines Aktivators mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Abbildung 1-4, Proteindatenbank (PDB)-Nummer: 1HUX) (Locher *et al.*, 2001). Aufgrund der Topologie gehört der Aktivator zur Actin-Faltungsfamilie (Kabsch & Holmes, 1995). In jedem Monomer ist ein Adenosin-5'-diphosphat (ADP)-Molekül nicht-kovalent gebunden, wobei ein Mg^{2+} -Ion wegen der Auflösung von 3,0 Å nicht beobachtet werden konnte.

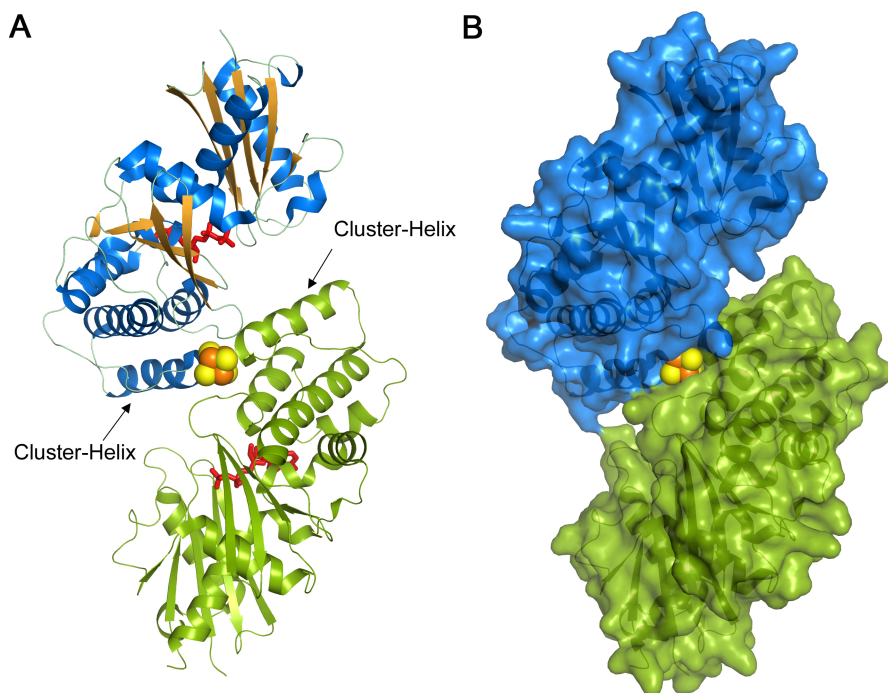


Abbildung 1-4: Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* (PDB-Nummer: 1HUX). Gezeigt ist die Unterseite des Proteins. **(A)** Bänderdarstellung des Proteinrückgrates, wobei ein Monomer in grün und das zweite Monomer entsprechend seiner Sekundärstrukturelemente (α -Helices in blau, β -Stränge in orange und *loops* in grün) eingefärbt ist. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugelmodell gezeigt (Eisenatome sind orange, Schwefelatome gelb), ADP als Stäbchenmodell (rot). **(B)** Oberflächendarstellung des Dimers. Die Monomere sind in blau und grün dargestellt, das Proteinrückgrat ist durch die Bänderdarstellung angedeutet. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugelmodell gezeigt (Farben wie in A).

Wie bereits erwähnt, enthält der Aktivator ein $[4Fe-4S]^{1+/2+}$ -Zentrum, was einzigartig für Actin-Faltungsproteine ist (Hurley, 1996). Dieses wird von je zwei Cysteinresten aus jedem Monomer koordiniert und verbrückt die Monomere miteinander. Das Fe/S-Zentrum ist auf der

Proteinoberseite vor dem Lösungsmittel geschützt, während es auf der Unterseite exponiert ist. Eine Helix aus jedem Monomer ist so positioniert, dass ihr N-Terminus direkt auf das Fe/S-Zentrum deutet, weshalb sie als Cluster-Helix bezeichnet wird.

Die zwei Cluster-Helices schließen einen Winkel von 103° ein (Helix-Cluster-Helix-Winkel). Das Redoxpotenzial des Aktivators konnte bislang nicht direkt gemessen werden. Die Reduktion mittels eines Flavodoxins (Hans *et al.*, 2002) bzw. eines Ferredoxins (Thamer *et al.*, 2003) deutet jedoch darauf hin, dass das Redoxpotenzial bei circa -350 mV oder höher liegt. *In vitro* kann der Aktivator durch chemische Reduktionsmittel wie Natriumdithionit oder Titan(III)citrat reduziert werden (Kim *et al.*, 2005). Mittels Titan(III)citrat wurde das [4Fe-4S]-Zentrum des Aktivators der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* sogar bis zum superreduzierten Zustand ($[4\text{Fe-4S}]^0$) reduziert (Hans *et al.*, 2008). Darüber hinaus bildet der Aktivator in Gegenwart des Übergangszustandsanalogons $\text{ADP}^*\text{AlF}_4^-$ mit der Dehydratase einen stabilen Komplex (Kim *et al.*, 2010).

Das Helix-Cluster-Helix-Motiv wurde auch in dem Eisen-Protein (Fe-Protein) der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* (*A. vinelandii*) gefunden, wobei der Helix-Cluster-Helix-Winkel mit gebundenem ADP circa 150° beträgt (Georgiadis *et al.*, 1992). Phylogenetisch sind die beiden Proteine nicht verwandt. Außerdem gehört das Fe-Protein aufgrund seiner Faltung zu den *nucleotide switch proteins* (Sprang, 1997). Das Fe-Protein erfüllt eine ähnliche Funktion wie der Aktivator, da es unter Hydrolyse von ATP ein Elektron auf das Molybdän-Eisen-Enzym (MoFe-Protein) der Nitrogenase überträgt (Howard & Rees, 1994). Es wurde gezeigt, dass das Fe-Protein in Gegenwart des ATP-Analogons Adenosin-5'-(β,γ -methylen)-triphosphat (ADPCP) bzw. des Übergangszustandsanalogons $\text{ADP}^*\text{AlF}_4^-$ einen Komplex mit dem MoFe-Protein bilden kann (Schindelin *et al.*, 1997; Tezcan *et al.*, 2005), wobei sich der Helix-Cluster-Helix-Winkel in dem Komplex mit $\text{ADP}^*\text{AlF}_4^-$ auf circa 180° öffnet (Schindelin *et al.*, 1997).

Basierend auf der Struktur des Aktivators mit ADP (Locher *et al.*, 2001), Chelatisierungsexperimenten mit Bathophenanthrolindisulfonat (Kim *et al.*, 2007) sowie in Analogie zu dem Fe-Protein der Nitrogenase wurde der in Abbildung 1-5 gezeigte Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen (Kim *et al.*, 2007).

Im Grundzustand ist das Fe/S-Zentrum oxidiert, der Aktivator hat ADP gebunden und der Helix-Cluster-Helix-Winkel beträgt 103° . Nun erfolgt die Reduktion des Fe/S-Zentrums, wodurch es zu konformationellen Änderungen kommt und die Unterseite des Proteins “verschlossen” wird, d.h. das Fe/S-Zentrum wird unzugänglich für das Solvens. Der anschließende Austausch von ADP durch ATP führt zur Öffnung des Helix-Cluster-Helix-

Winkels auf 180 °. Da über die Reihenfolge der Ereignisse nichts bekannt ist, kann der Nukleotidaustausch auch vor der Reduktion erfolgen, wobei die mit jedem Schritt verbundenen Konformationsänderungen gleich bleiben.

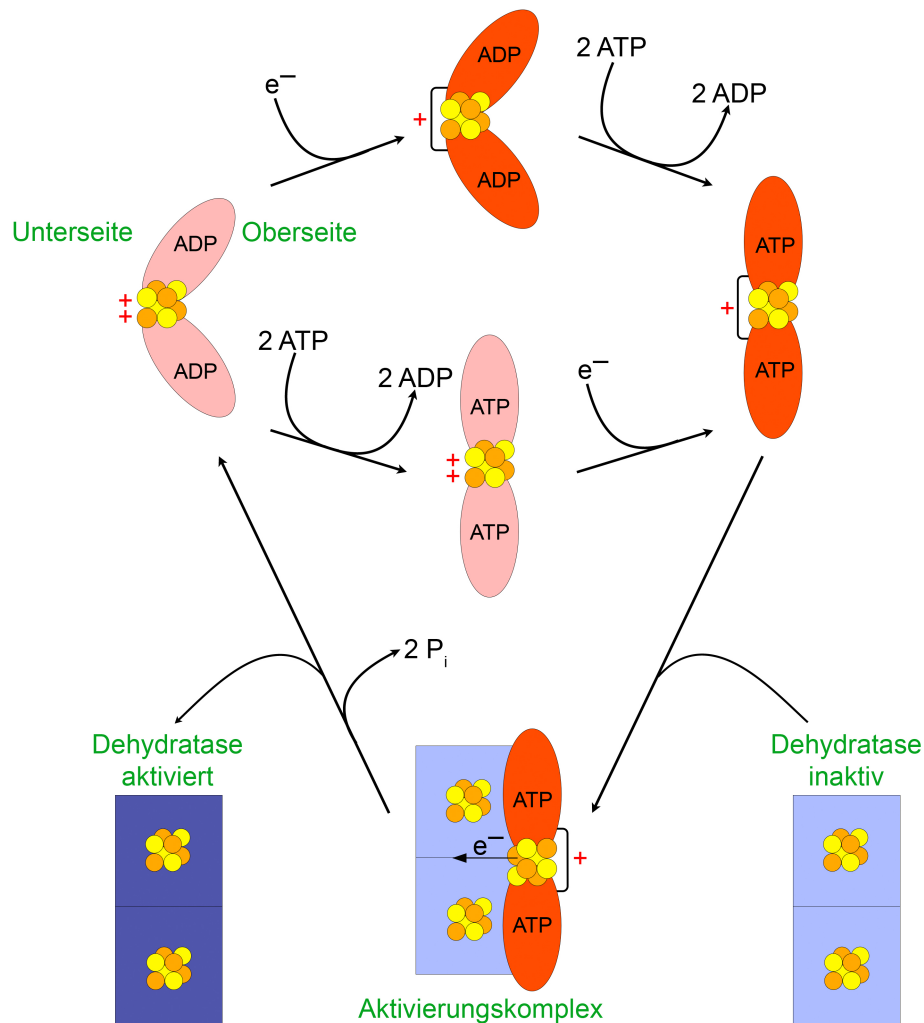


Abbildung 1-5: Vorgeschlagener Aktivierungsmechanismus der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen. Der Aktivator ist in rot gezeigt, die Dehydratase in blau. Helle Farben deuten den oxidierten Zustand, dunkle Farben den reduzierten Zustand eines Enzyms an. Die Reduktion des Aktivators führt zu strukturellen Änderungen, so dass die Unterseite des Aktivators verschlossen wird und das Fe/S-Zentrum nicht mehr Solvens-exponiert ist. Der Helix-Cluster-Helix-Winkel öffnet sich nach dem Austausch von ADP durch ATP von 105 ° auf 180 °. Verändert nach (Kim *et al.*, 2007).

Der reduzierte und ATP-gebundene Aktivator kann nun mit der Dehydratase einen Komplex bilden und überträgt unter Hydrolyse von ATP ein Elektron auf die Dehydratase. Die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie ist für den Elektronentransfer notwendig, da das Redoxpotenzial der Dehydratase mit ≤ -600 mV negativer ist als das des Aktivators. Zudem führt die ATP-Hydrolyse dazu, dass der Aktivator wieder in seinen Grundzustand zurückkehrt und von der aktivierten Dehydratase abdissoziiert. Somit wird der Elektronentransfer irreversibel. Der Aktivator wurde auch als "Archerase" bezeichnet, da der Elektronentransfer

vom Aktivator auf die Dehydratase zum einen an einen Bogenschützen erinnert, der einen Pfeil abschießt. Zum anderen ähneln die vorgeschlagenen Änderungen des Helix-Cluster-Helix-Winkels den Bewegungen der Bogenschnur während des Schießens (Kim *et al.*, 2004).

1.3.2 Die Dehydratase und die Bildung von Ketylradikalen

Die Dehydratase aus *A. fermentans*, *C. symbiosum*, *C. propionicum* und *C. difficile* ist jeweils ein Heterodimer (α - und β -Untereinheit) mit einem oder zwei [4Fe-4S]-Zentren (Kim *et al.*, 2004). Die Dehydratase der Phenyllactat-Dehydratase aus *C. sporogenes* stellt eine Besonderheit dar, da sie noch eine dritte Untereinheit besitzt (Dickert *et al.*, 2000; Dickert *et al.*, 2002). Diese stellt die größte der drei Untereinheiten dar und wurde als Cinnamoyl-CoA:Phenyllactat-CoA-Transferase charakterisiert. Sie katalysiert die Bildung von Phenyllactyl-CoA aus Phenyllactat und Cinnamoyl-CoA, weshalb die Phenyllactyl-CoA-Dehydratase für die Aktivität katalytische Mengen von Cinnamoyl-CoA benötigt. Die anderen beiden Untereinheiten sind homolog zu der α - und β -Untereinheit der anderen (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen. Mit Ausnahme der Phenyllactat-Dehydratase ist die CoA-Transferase bei allen (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase-Systemen als separates Enzym vorhanden. Eine weitere Besonderheit ist die Dehydratase aus *F. nucleatum* (Klees *et al.*, 1992). Auch sie liegt als Heterotrimer vor, doch scheint die dritte Untereinheit mit keinem anderen Protein verwandt zu sein und es konnte ihr auch bislang keine Funktion zugewiesen werden. Darüber hinaus wurde bei einigen Dehydratasen die Anwesenheit von Riboflavin-5'-monophosphat (FMN) oder Riboflavin beobachtet.

Kim *et al.* konnten mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie für die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase ein kinetisch kompetentes Produkt-verwandtes allylisches Ketylradikal nachweisen {Kim, 2008 #5}, was den Vorschlag bestätigte, dass die Dehydratisierung über Ketylradikale verläuft (Buckel & Keese, 1995). Abbildung 1-6 zeigt den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus am Beispiel der Dehydratisierung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA.

Wie bereits erwähnt ist das β -Wasserstoffatom in (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA nicht azid ($pK_a \sim 40$) (Smith *et al.*, 2003). Die aktivierte Dehydratase überträgt nun ein Elektron auf die elektrophile Carbonylgruppe der Thioesterbindung, die dadurch zu einem nukleophilen Ketylradikalanion wird. Dieser Prozess wird als „Umpolung“ bezeichnet (Seebach, 1979) und entspricht einer Polaritätsinversion. Das Ketylradikalanion wird durch die Wechselwirkung des Sauerstoffatoms mit dem halb gefüllten $2p_z$ -Orbital des Kohlenstoffatoms stabilisiert (Brückner, 2003).

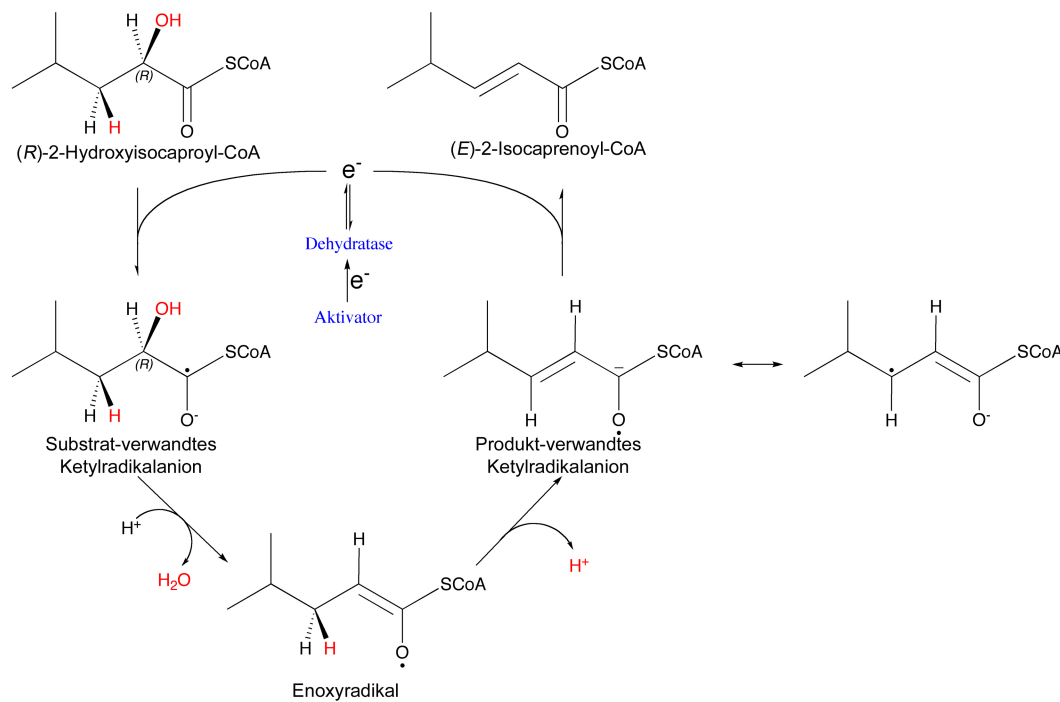


Abbildung 1-6: Vorgeschlagener Mechanismus für die enzymatische Dehydratisierung von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA mittels Ketylradikalen. Verändert nach (Kim *et al.*, 2008).

Das Substrat-verwandte Ketylradikalanion eliminiert nun die 2-Hydroxygruppe. In dem resultierenden Enoxyradikal ist die Azidität des β -Wasserstoffatoms sehr viel höher ($pK_a \sim 14$) als im Substrat (Smith *et al.*, 2003), so dass das β -Wasserstoffatom durch eine Base innerhalb des Enzyms abstrahiert werden kann. Wasserstoffbrückennetzwerke könnten den pK_a -Wert des β -Wasserstoffatoms sogar noch weiter senken (Smith *et al.*, 2003). Die Deprotonierung führt zu dem Produkt-verwandten Ketylradikalanion, das mesomeriestabilisiert ist und mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Kim *et al.*, 2008). Schließlich führt eine Oxidation zu dem Produkt Isocaprenoyl-CoA, wobei das katalytische Elektron zurück auf die Dehydratase übertragen wird und dort für die nächste Dehydratisierung zur Verfügung steht. Durch die Wiedergewinnung des Elektrons kann die Dehydratase bis zu 10.000 Umsätze katalysieren. Erst dann ist eine weitere Aktivierung notwendig. Die hohe Zahl an Umsätzen pro Aktivierung ist erforderlich, um die Fermentation der α -Aminosäuren mittels des 2-Hydroxyacyl-Weges zur Energiegewinnung nutzen zu können, da die ATP-Ausbeute pro Umsatz nur gering ist. So ergibt die Fermentation von 3 Mol Leucin etwa 1,75 Mol ATP (Kim *et al.*, 2005), die Fermentation von 3 Mol Glutamat etwa 1,8 Mol ATP (Hartel & Buckel, 1996).

1.3.3 Die (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

Das obligatorisch anaerobe, humanpathogene Bakterium *C. difficile* verursacht durch übermäßiges Wachstum im Verdauungstrakt pseudomembranöse Kolitis, im Krankenhaus erworbene Diarrhöe und führt gelegentlich zum Tod (Sebahia & Thomson, 2006). Bei der Pathogenizität spielen die Synthese von Toxinen (Reineke *et al.*, 2007) und die Produktion von giftigem *p*-Cresol aus Tyrosin (Selmer & Andrei, 2001) eine Rolle sowie eine Vielzahl von Aminosäurefermentationen (Sebahia *et al.*, 2006). Für das Wachstum von *C. difficile* ist die proteinogene Aminosäure L-Leucin unverzichtbar, die als Energiesubstrat genutzt werden kann (vgl. Abbildung 1-1). Die Dehydratisierung von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA zu Isocaprenoyl-CoA wird von der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase katalysiert (vgl. Abbildung 1-2). Bei dem Reaktionsprodukt handelt es sich wahrscheinlich um das *E*-Isomer ($K'_{eq} = 1600$) (Parthasarathy *et al.*, 2010).

Im Genom von *C. difficile* findet man die in Abbildung 1-7 gezeigte Genanordnung für das (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase-System, wobei “*had*” für “**H**ydroxy**a**cy**l**-Co**A** **D**ehydratase” steht (Dickert *et al.*, 2002). Diese Anordnung ist ähnlich zu der Genanordnung, die auch für das Phenyllactat-Dehydratase-System in *C. sporogenes* gefunden wurde (Dickert *et al.*, 2002).

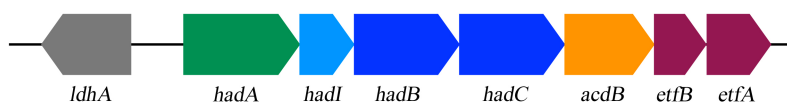


Abbildung 1-7: Genanordnung des (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase-Systems von *C. difficile*. *ldh*: Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase, *hadA*: (E)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase, *hadI*: Aktivator der Dehydratase, *hadBC*: Dehydratase, *acdB*: Acyl-CoA-Dehydrogenase, *eftBA*: Elektronen-übertragendes Flavoprotein. Verändert nach (Kim *et al.*, 2005).

Die Gene für den Aktivator (*hadI*) und die Dehydratase (*hadBC*) liegen unmittelbar hintereinander. Stromaufwärts von *hadI* ist das Gen für die (E)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase zu finden (*hadA*). Diese ist für den CoA-Transfer direkt vor der Dehydratisierung und im letzten Schritt des reduktiven Zweigs verantwortlich. Drei weitere offene Leseraster bilden zusammen mit *hadA* und *hadIBC* eine transkriptionelle Einheit. Weiterhin gibt es stromaufwärts von *hadA* ein offenes Leseraster in entgegengesetzter Richtung, das für die Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (*ldhA*) codiert. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von 2-Oxoisocaproat zu (R)-2-Hydroxyisocaproat (Kim *et al.*, 2006).

Der Aktivator und die Dehydratase der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase wurden erstmals von Kim *et al.* charakterisiert (Kim *et al.*, 2005). Der Aktivator (HadI) weist sowohl

im oxidierten als auch im reduzierten Zustand geringe ATPase-Aktivität auf, die in Gegenwart der Dehydratase (HadBC) deutlich gesteigert wird. Er besitzt ein [4Fe-4S]-Zentrum und kann zur Aktivierung der Dehydratase verwendet werden, mit der er in Gegenwart von $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ einen stabilen Komplex bilden kann (Kim *et al.*, 2010). Die Analyse der Dehydratase ergab, dass das Heterodimer ein oder zwei [4Fe-4S]-Zentren besitzt und von allen bislang charakterisierten 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen die höchste Aktivität besitzt (Kim *et al.*, 2005). Es konnten keine biochemischen Unterschiede zwischen nativ in *C. difficile* und heterolog in *E. coli* produzierter Dehydratase festgestellt werden. Weiterhin ist die (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase bislang das einzige 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase-System, von dem der Aktivator und die Dehydratase aus dem gleichen Organismus charakterisiert wurden.

1.4 Dehydratasen mit Eisen-Schwefel-Zentren

In vielen biochemischen Reaktionswegen sind Dehydratasen zu finden. Diese Enzyme sind Kohlenstoff-Sauerstoff-Lyasen (EC-Nummer 4.2.-.-) und katalysieren die Eliminierung von Wasser aus einer organischen Verbindung. Eine Unterscheidung von verschiedenen Dehydratasetypen ist aufgrund einiger Merkmale möglich. Zunächst unterscheiden sie sich in den Kofaktoren, die sie beinhalten. So enthalten einige Dehydratasen keine Kofaktoren, während andere Fe/S-Zentren oder Flavine aufweisen (Buckel & Golding, 1998; Switzer, 1989). Ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung sind die Positionen im Substrat, an der sich die zu eliminierende Hydroxygruppe und das zu abstrahierende Wasserstoffatom befinden.

Die meisten Dehydratasen katalysieren eine α/β -Eliminierung und werden als typische Dehydratasen bezeichnet (Abbildung 1-8). Bei dem Substrat befindet sich die zu abstrahierende Hydroxygruppe am β -Kohlenstoffatom und das Wasserstoffatom, das als Proton eliminiert wird, ist am α -Kohlenstoff lokalisiert. Dieses α -Wasserstoffatom wird hierbei durch benachbarte, elektronenziehende Gruppen, wie z.B. Carboxylat- oder Carbonylgruppen, aktiviert. Prominentester Vertreter dieser Gruppe ist die Aconitase, die im Zitronensäure-Zyklus eine wichtige Rolle spielt (Beinert *et al.*, 1996).

Bei den atypischen Dehydratasen muss ein Wasserstoffatom von einer nicht aktivierten Position, wie dem β - oder γ -Kohlenstoffatom in 2-, 4- oder 5-Hydroxyacyl-CoA-Derivaten, abstrahiert werden (Abbildung 1-8) (Buckel & Golding, 2006). Beispiele für solche Dehydratasen sind die in Abschnitt 1.3 beschriebenen (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen.

Das zu eliminierende Proton befindet sich hier am β -Kohlenstoffatom und ist nicht aktiviert, während die Hydroxygruppe am α -Kohlenstoffatom gebunden ist.

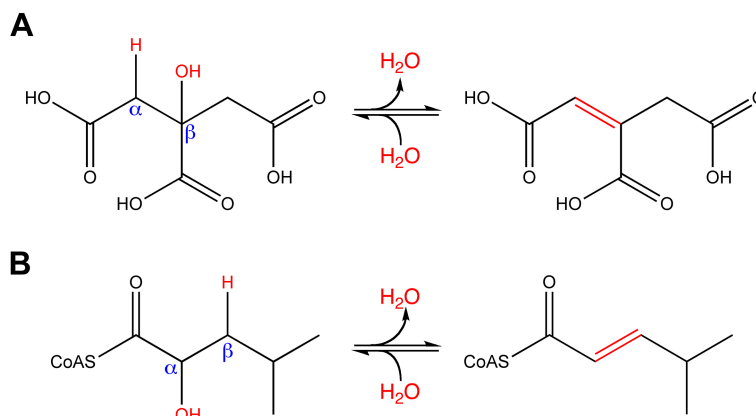


Abbildung 1-8: (A) Typische Dehydratisierung am Beispiel der Aconitase. (B) Atypische Dehydratisierung am Beispiel der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase.

1.4.1 Aconitase

Die Aconitase katalysiert im Zitronensäure-Zyklus die stereospezifische und reversible Dehydratisierung von Citrat zu *cis*-Aconitat und dessen Rehydratisierung zu (2*R*,3*S*)-Isocitrat (Abbildung 1-9) (Beinert *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 1992). Die Dehydratase enthält ein [4Fe-4S]-Zentrum, wobei drei der Eisenatome des Fe/S-Zentrums von je einem Cysteinrest koordiniert sind, während der Ligand des vierten Eisenatoms in Abwesenheit von Substrat ein Hydroxidion ist (Robbins & Stout, 1989; Werst *et al.*, 1990). An Luft wird das Enzym inaktiviert, da das [4Fe-4S]²⁺-Zentrum zu einem [4Fe-4S]³⁺-Zentrum oxidiert wird. Dieses ist instabil und verliert das nicht-Cystein-koordinierte Fe²⁺-Ion, so dass ein [3Fe-4S]⁺-Zentrum resultiert (Beinert *et al.*, 1996). Aufgrund der Sonderstellung wird dieses Eisenatom als “besonderes Eisenatom” oder “labiles Eisenatom” bezeichnet.

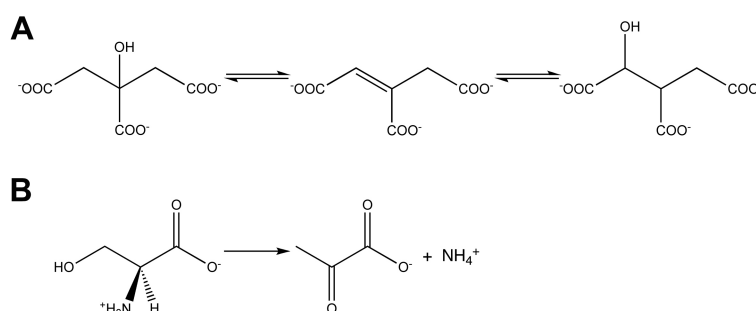


Abbildung 1-9: Von (A) Aconitase und (B) bakterieller L-Serin-Dehydratase katalysierte Reaktionen.

Während der Katalyse binden sowohl das Edukt Citrat sowie das Produkt Isocitrat mit der Hydroxygruppe und der benachbarten α -Carboxylgruppe an das besondere Eisenatom, woraus sich für dieses eine oktaedrische Koordination ergibt (Lauble *et al.*, 1992; Werst *et al.*,

1990). Das [4Fe-4S]-Zentrum dient somit als Lewis-Säure und hat keine Elektronen-Transfer-Funktion. Nach der Dehydratisierung muss das resultierende Zwischenprodukt *cis*-Aconitat für die nachfolgende Rehydratisierung umorientiert werden (Lauble *et al.*, 1994).

1.4.2 Die bakterielle L-Serin-Dehydratase

L-Serin kann von einer Vielzahl von Enzymen desaminiert werden, wobei Pyruvat und Ammoniak bzw. ein Ammoniumion gebildet werden (Abbildung 1-9). Diese Enzyme gehören zu zwei Enzymfamilien: die Serin/Threonin-Dehydratasen (Übersichtsartikel in (Snell *et al.*, 1970)) und die bakteriellen L-Serin-Dehydratasen (Grabowski & Buckel, 1991; Hofmeister *et al.*, 1993). Die Dehydratisierung verläuft jeweils in drei Schritten. Zunächst wird die β -Hydroxyaminosäure zu dem Enamin dehydratisiert, das anschließend zu dem Oximin tautomerisiert. Schließlich erfolgt die Hydrolyse des Oximins in die 2-Oxosäure und Ammoniak.

Während die Serin/Threonin-Dehydratasen Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) als Kofaktor in der Katalyse verwenden, enthalten die bakteriellen L-Serin-Dehydratasen ein [4Fe-4S]-Zentrum. Letztere kommen ausschließlich in Prokaryoten vor. Bislang wurden die bakterielle L-Serin-Dehydratasen aus *Peptostreptococcus asaccharolyticum* (Grabowski & Buckel, 1991; Hofmeister *et al.*, 1994), *C. propionicum* (Hofmeister *et al.*, 1993), *Clostridium sticklandii* (Zinecker *et al.*, 1998) und *E. coli* (Cicchillo *et al.*, 2004) charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass das [4Fe-4S]-Zentrum essentiell für die Katalyse ist und von drei Cysteinresten koordiniert wird (Cicchillo *et al.*, 2004). In Abwesenheit von Substrat ist ein Wassermolekül oder Hydroxidion der Ligand des vierten, besonderen Eisenatoms. Gelangt L-Serin in das aktive Zentrum, so verdrängt es den Wasserliganden und koordiniert das Eisenatom mittels seiner Hydroxygruppe. Für die Katalyse wird ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Aconitase vorgeschlagen, wobei sich die Systeme in der Koordinierung des besonderen Eisenatoms unterscheiden: Während bei der Aconitase das Substrat mit zwei funktionalen Gruppen das Fe/S-Zentrum koordiniert, interagiert bei der bakteriellen L-Serin-Dehydratase das Substrat nur über die Hydroxygruppe mit dem besonderen Eisenatom. Strukturelle Daten der bakteriellen L-Serin-Dehydratasen sind nicht bekannt.

1.5 Die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase

In dem reduktiven Zweig der Fermentation von L-Leucin mittels des 2-Hydroxyacyl-Weges (Abbildung 1-1) muss (*R*)-2-Hydroxyisocaproat aktiviert werden, indem es mit CoA verestert wird. Diese Reaktion wird von der (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-

Transferase katalysiert (Kim *et al.*, 2006). Das entsprechende Gen befindet sich in der Transkriptionseinheit des (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase-Systems (vgl. Abbildung 1-7). Die CoA-Transferase katalysiert darüber hinaus auch den letzten Schritt des reduktiven Zweigs, die Umwandlung von Isocaproyl-CoA zu Isocaproat. Aufgrund der Aminosäuresequenz wird die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase der Familie III der CoA-Transferasen zugeordnet (Heider, 2001; Kim *et al.*, 2006).

Allgemein katalysieren CoA-Transferasen den reversiblen Transfer der Coenzym A-Gruppe von einem CoA-Thioester auf eine freie Säure. Basierend auf ihrem Reaktionsmechanismus werden sie in drei Familien unterteilt (Heider, 2001). Die Familie I stellt die größte Gruppe dar und enthält CoA-Transferasen für 3-Oxosäuren (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1997; Parales & Harwood, 1992; White & Jencks, 1976), kurzkettige Fettsäuren (Barker *et al.*, 1978; Sramek & Frerman, 1975; Wiesenborn *et al.*, 1989) und Glutaconat (Buckel *et al.*, 1981; Jacob *et al.*, 1997; Mack & Buckel, 1995). Als CoA-Donor dienen hier meist Succinyl-CoA oder Acetyl-CoA. Die Enzyme enthalten zwei verschiedene Untereinheiten und kommen entweder als Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) oder als Heterooktamer ($\alpha_4\beta_4$) vor. Eine Ausnahme stellt die Succinyl-CoA:Acetoacetat-CoA-Transferase aus Säugetieren dar, die nur aus einer Untereinheit besteht. Diese umfasst jedoch Domänen, die zu den α - und β -Untereinheiten der anderen Enzyme ortholog sind (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1997; Parales & Harwood, 1992). Die Reaktion verläuft mittels eines Ping-Pong-Mechanismus, der die abwechselnde Bildung von Thioestern und gemischten Anhydriden als Intermediate beinhaltet. Hierbei fungiert ein Glutamatrest als Akzeptor für kovalent gebundene Intermediate.

Die Familie II ist sehr klein und umfasst die homodimeren α -Untereinheiten der Citrat-Lyase und Citramalat-Lyase (Buckel *et al.*, 1971; Buckel & Bobi, 1976; Dimroth & Eggerer, 1975). Diese Enzyme katalysieren den Transfer von einem Acyl-Träger-Protein (ACP), das ein kovalent gebundenes CoA-Derivat enthält. *In vitro* akzeptieren die Enzyme jedoch auch freie CoA-Thioester. Im Reaktionsverlauf treten keine kovalent gebundenen Intermediate auf, sondern der Mechanismus verläuft über einen ternären Komplex (Buckel *et al.*, 1971; Dimroth & Eggerer, 1975; Selmer & Buckel, 1999).

Die Aminosäuresequenzen von Vertretern der Familie III unterscheiden sich grundlegend von denen der Mitglieder der Familien I und II. Kinetische Untersuchungen haben zunächst nahegelegt, dass der Reaktionsmechanismus über einen ternären Komplex verläuft (Dickert *et al.*, 2000; Leutwein & Heider, 2001), ähnlich wie bei Enzymen der Familie II ist, wobei CoA-Thioester verwendet werden anstatt ACP-Thioester. Kinetische und strukturelle Arbeiten an verschiedenen CoA-Transferasen deuten mittlerweile jedoch darauf hin, dass kovalent

gebundene Intermediate involviert sind (Jonsson *et al.*, 2004; Ricagno *et al.*, 2003; Stenmark *et al.*, 2004). Bei der CoA-Transferase aus dem Carnitin-Metabolismus (CaiB) konnte ein konservierter Aspartatrest im aktiven Zentrum identifiziert werden, der ähnlich wie der Glutamatrest im aktiven Zentrum der CoA-Transferasen der Familie I, für die Übertragung des CoA verantwortlich sein könnte (Stenmark *et al.*, 2004). Somit wird ein Mechanismus ähnlich zu dem der Familie I-CoA-Transferasen postuliert. Die Enzyme der Familie III kommen als Monomere, Dimere oder als Teile von komplexen Systemen vor. Die erste CoA-Transferase dieser Familie war die Formyl-CoA:Oxalat-CoA-Transferase (Frc) aus *Oxalobacter formigenes* (Baetz & Allison, 1990; Sidhu *et al.*, 1997). Ein weiteres Mitglied ist das *E. coli*-Potein YfdW, von dem angenommen wird, dass es sich um eine *E. coli*-Formyl-CoA:Oxalat-CoA-Transferase handelt (Gogos *et al.*, 2004; Gruez *et al.*, 2003; Ricagno *et al.*, 2003). Darüber hinaus gehört auch die (*E*)-Cinnamoyl-CoA:(*R*)-Phenyllactat-CoA-Transferase aus *C. sporogenes*, die im reduktiven Zweig der Fermentation von Phenyllalanin eine Rolle spielt, zur Familie III der CoA-Transferasen (Dickert *et al.*, 2000). Wie beschrieben ist sie Teil der heterotrimeren Phenyllactat-CoA-Dehydratase (siehe Abschnitt 1.3.2).

Wie bereits erwähnt gehört auch die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase zur Familie III. Das Homodimer wurde erstmals von Kim *et al.* charakterisiert, wobei sowohl der CoA-Transfer von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA auf (*E*)-2-Isocaprenoat sowie der CoA-Transfer von (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA auf (*R*)-2-Hydroxyisocaproat gezeigt wurden (Kim *et al.*, 2006). Durch Mutageneseexperimente wurde das konservierte Aspartat 171 als katalytisch essentieller Rest identifiziert (Kim *et al.*, 2006). Dieser spielt wahrscheinlich bei der Bildung eines gemischten Anhydrids mit der Acylgruppe des Thioestersubstrates eine Rolle. In allen (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratase-Systemen finden sich CoA-Transferasen. Während jedoch die (*E*)-Cinnamoyl-CoA:(*R*)-Phenyllactat-CoA-Transferase und die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase zur Familie III der CoA-Transferasen gehören, sind die Propionat-CoA-Transferase und Glutaconat-CoA-Transferase Mitglieder der Familie I.

2 Ziele

Viele chemisch schwierige Reaktionen werden in der Natur durch Radikalenzyme katalysiert. Die Mehrzahl der Radikalenzyme benötigt komplexe Kofaktoren wie Coenzym B₁₂ oder SAM, um die katalytisch aktiven Radikale zu erzeugen. Im Gegensatz hierzu bilden die (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen eine eigene Gruppe an Radikalenzymen, die für die Generierung des Radikals nur ein einzelnes, hoch energetisches Elektron nutzen. Diese Enzyme spielen eine Rolle in der Fermentation von zwölf der 20 proteinogenen Aminosäuren durch anaerobe Bakterien, hauptsächlich Clostridien.

Ein Vertreter ist die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus dem humanpathogenen Bakterium *C. difficile*. Das Enzym katalysiert den chemisch schwierigsten Schritt im reduktiven Zweig der L-Leucin-Fermentation, die fast irreversible β/α -Eliminierung von Wasser aus (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA. Diese Reaktion basiert auf der reduktiven Erzeugung von Ketylradikalen im Substrat. Die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase besteht aus einem Aktivator und der eigentlichen Dehydratase. Zur Aktivierung überträgt der Aktivator unter ATP-Hydrolyse ein hoch energetisches Elektron auf die Dehydratase. Weiterhin ist in dem reduktiven Zweig des Fermentationsweges vor und nach der Dehydratisierung der Transfer von einem CoA-Molekül notwendig, was von der (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase katalysiert wird.

Basierend auf Aminosäuresequenzvergleichen wird die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase der Familie III der CoA-Transferasen zugeordnet. In dieser Arbeit sollte als erstes Ziel die Transferase strukturell untersucht und die Rolle des katalytisch essentiellen Aspartatrestes geklärt werden.

Der Aktivator überträgt ATP-abhängig ein Elektron auf die Dehydratase und aktiviert diese. Während der Aktivator in Gegenwart des Übergangszustandsanalogons ADP*AlF₄⁻ einen stabilen Komplex mit der Dehydratase bildet, ist dies in Anwesenheit von ADP nicht der Fall. Zudem deuten Chelatisierungsexperimente auf konformationelle Änderungen während des Aktivierungsmechanismus hin, die jedoch noch nicht näher charakterisiert wurden. Um den Aktivierungsmechanismus auf molekularer Ebene zu verstehen, sollten die postulierten Nukleotid- und redox-abhängigen Konformationsänderungen des Aktivators sowie die Komplexbildung in dieser Arbeit biochemisch, spektroskopisch und strukturell untersucht werden.

Radikalchemie stellt an Enzyme hohe Ansprüche, da die Erzeugung, Speicherung und Reaktion der hoch reaktiven Ein-Elektronen-Spezies stark kontrolliert werden muss, um Schäden am Protein oder der Zelle durch freie Radikale zu verhindern. Wie die Strukturen der Coenzym B₁₂-abhängigen Glutamat-Mutase und der SAM-abhängigen Lysin-2,3-Aminomutase zeigen, hat die Natur Wege gefunden, diese Probleme zu lösen. Für die (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen ist die strukturelle Basis der Radikalkatalyse, d.h. die molekulare Grundlage für die Substratbindung und die kontrollierte Radikalerzeugung und Radikalkontrolle unverstanden. Weiterhin ist unbekannt, wie das hoch energetische Elektron in der Dehydratase gespeichert wird und unspezifische Nebenreaktionen vermieden werden, so dass ein Elektron für bis zu 10.000 Umsätze verwendet werden kann. Drittes Ziel dieser Arbeit war deshalb die biochemische, spektroskopische und insbesondere strukturelle Untersuchung der Dehydratase, um die molekulare Basis der Radikalkatalyse in diesem Enzym zu entschlüsseln.

3 Material und Methoden

3.1 Anoxisches Arbeiten

Die Produktion des Aktivators und der Dehydratase in *E. coli* wurde unter anoxischen Bedingungen durchgeführt. Die Medien wurden in mit Butylsepten verschlossenen Flaschen autoklaviert, wobei über eine Kanüle Überdruck entweichen konnte. Die Kanüle wurde entfernt so lange das Medium noch heiß war und das Loch wurde mit Parafilm verschlossen. Das Animpfen von Kulturen erfolgte ebenfalls anoxisch. Zum Ernten wurden die Kulturen in einen anoxischen Handschuhkasten unter einer Atmosphäre von 95 % N₂ und 5 % H₂ überführt und dort in Zentrifugenbecher gefüllt.

Die Reinigung, biochemische Charakterisierung und Kristallisation sowie *soaking*-Experimente und das Einfrieren von Kristallen des Aktivators und der Dehydratase wurden in einem anoxischen Handschuhkasten unter einer Atmosphäre von 95 % N₂ und 5 % H₂ durchgeführt.

Puffer und Lösungen wurden anaerobisiert, indem sie an einer Vakuum-Gas-Anlage abwechselnd entgast und anschließend mit N₂ begast wurden. Es wurden mindestens vier solcher Zyklen ausgeführt. Reduktionsmittel wurden unmittelbar vor Gebrauch der Lösung im Handschuhkasten zugeben.

3.2 Chemikalien, Biochemikalien, Materialien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Materialien sind einschließlich ihrer Bezugsquelle im Anhang (Abschnitt 9.1) aufgelistet. Zur Herstellung von Kristallisationslösungen wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades eingesetzt. In Abschnitt 9.2 sind alle verwendeten Geräte aufgeführt.

3.3 Bakterienstämme

Für die Genexpression von *hadI* und *hadBC* wurde der Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL verwendet. Dieser besitzt den Genotyp *E. coli* B F⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam^r]. Für die Genexpression von *hadA* wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem Genotyp *E. coli* B F⁻ *ompT* gal *dcm*⁺ *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) verwendet.

3.4 Rekombinante Plasmide

In Tabelle 3-1 sind die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Plasmide aufgeführt. Sie wurden alle von der Arbeitsgruppe Wolfgang Buckel (Philipps-Universität Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-1: Rekombinante Plasmide. Es sind die zu Grunde liegenden Vektoren, die klonierten Gene sowie die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen aufgeführt.

Plasmidname	zu Grunde liegender Vektor	kloniertes Gen	Schnittstellen
pASK-IBA 3/ <i>hadI</i>	pASK-IBA 3	<i>hadI</i> aus <i>C. difficile</i>	<i>Eco31I</i>
pASK-IBA 3/ <i>hadBC</i>	pASK-IBA 3	<i>hadBC</i> aus <i>C. difficile</i>	<i>Eco31I</i>
pASK-IBA 3/ <i>hadA</i>	pASK-IBA 3	<i>hadA</i> aus <i>C. difficile</i>	<i>Eco31I</i>

3.5 Elektrotransformation

Luria-Bertani (LB)-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

LB-Agar: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar

Bei der Elektrotransformation wurde 1 µl Plasmid zu 50 µl elektrokompenter *E. coli*-Zellen gegeben, die auf Eis aufgetaut worden waren. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurde die Transformation mittels eines Elektroschocks mit 2.500 V durchgeführt. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und es folgte eine Inkubation für 45 min bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die Zellsuspension wurde für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Schließlich erfolgten das Ausplattieren auf einer LB-Agar-Platte, die entsprechende Antibiotika enthielt, und die Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

3.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel: 12 % (w/v) Acrylamid, 375 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) / HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,08 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED), 0,05 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Sammelgel: 6 % (w/v) Acrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,08 % (v/v) TEMED, 0,05 % (w/v) APS

Probenpuffer (4 x):	200 mM Tris (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin, 400 mM Dithiothreitol (DTT)
Laufpuffer (10 x):	1,92 M Glycin, 248 mM Tris, 1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	0,025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit Probenpuffer in einer Endkonzentration von 1 x versetzt, für 10 min bei 100 °C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Während der Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 V für das Sammelgel und 120 V für das Trenngel verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt bevor das Trenngel für circa 30 min gefärbt und anschließend für mehrere Stunden entfärbt wurde.

3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde zum einen nach der Bradfordmethode (Bradford, 1976) bestimmt, wobei die Reagenzien und das Protokoll der Firma BioRAD verwendet wurden. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung über die Absorption bei 280 nm und dem durch PROTPARAM (Gasteiger *et al.*, 2003) ermittelten, theoretischen Extinktionskoeffizienten.

3.8 Alignments von Aminosäuresequenzen

Alignments von Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) erstellt und mittels Genedoc (Nicholas *et al.*, 1997) editiert.

3.9 Die (E)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase

3.9.1 Genexpression

Standard I-Medium:	15 g/l Trypton/Pepton, 3 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl, 1 g/l α -D-Glucose
Anhydrotetracyclin:	2 mg/ml Dimethylformamid (DMF)
Waschpuffer:	100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
Ampicillin:	50 mg/ml

Für die Genexpression wurde das Plasmid pASK-IBA 3/*hadA* verwendet (siehe Tabelle 3-1),

als Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) und als Medium diente Standard I-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt. Die Expression wurde leicht modifiziert nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2006) durchgeführt.

Das Plasmid wurde mittels Elektrotransformation in den Expressionsstamm eingebracht. Eine Kolonie der transformierten Zellen wurde zum Animpfen von 100 ml Medium verwendet. Diese Vorkultur wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 l Medium in einem 2l-Glasfermenter mit der gesamten Vorkultur angeimpft und bei 30 °C im Wasserbad unter Durchmischung von Druckluft inkubiert. Erreichte die optische Dichte bei 595 nm einen Wert von circa 0,7, erfolgte die Induktion mittels Anhydrotetracyclin (AHT) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml und die Kultur wurde über Nacht unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden circa 16 Stunden nach Induktion mittels Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 6.000 x g geerntet. Die Zellpelets wurden in 200 ml Waschpuffer resuspendiert, vereinigt und erneut für 5 min bei 4 °C und 6.000 x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde bei -30 °C eingefroren und gelagert.

3.9.2 Proteinreinigung

Puffer A: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0)

Puffer B: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) , 1 M NaCl

Puffer C: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 M Ammoniumsulfat

Puffer D: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 500 mM NaCl

Puffer E: 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 500 mM NaCl 2,5 mM D-Desthiobiotin (DTB)

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung

Nachdem die Zellen einer Genexpression in 50 ml Puffer A resuspendiert worden waren wurden 50 mg Lysozym und 1 mg DNase I zugegeben und die Zellsuspension wurde für 15 min unter Rühren auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mittels Sonifizierung an einem Branson Sonifier (Mikrospitze, *duty cycle*: 55 %, *output control*: 5). Hierauf folgte eine Ultrazentrifugation für 60 min bei 9 °C und 100.000 x g.

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Sepharose FastFlow-Säule (50 ml Säulenvolumen (SV)) geladen. Die Säule wurde mit 4 SV Puffer A gewaschen bevor die Elution mit einem linearen Gradient von Puffer A nach Puffer B über 10 SV erfolgte. Die Fraktionen, die die CoA-Transferase enthielten, wurden vereinigt und durch langsame Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung unter Rühren auf Eis auf eine Konzentration von 1,1 M Ammoniumsulfat eingestellt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine mit Puffer C äquilibrierte Phenyl-Sepharose 6 FastFlow-Säule (22 ml SV) geladen. Nach dem

Waschen der Säule mit 3 SV Puffer C erfolgte die Elution mit einem linearen Gradient von Puffer C nach Puffer A über 10 SV. Die CoA-Transferase enthaltenden Fraktionen wurde vereinigt und mittels Ultrafiltration (VivCell 70-Konzentrator, Molekulargewichtsgrenze: 30 kDa, 1.000 x g, 4 °C) bis zu einem Endvolumen von circa 50 ml konzentriert. Als letzter Chromatographieschritt wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Eine 12 ml-Strep-Tactin-Superflow-Säule wurde mit 10 SV Puffer D äquilibriert, mit Proteinlösung beladen und mit 10 SV Puffer D gewaschen. Die CoA-Transferase wurde mit 50 ml Puffer E eluiert. Die Fraktionen, die die CoA-Transferase enthielten, wurden vereinigt und es folgte ein Pufferaustausch gegen Puffer A mittels einer Sephadex G25-Säule. Schließlich wurde das gereinigte Protein mit VivaCell 70-Konzentratoren (Molekulargewichtsgrenze: 30 kDa) bei 1.000 x g und 4 °C bis zu einer Endkonzentration von 20-30 mg/ml konzentriert bevor es in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und gelagert wurde.

3.9.3 Analytische Gelfiltration

Gelfiltrationspuffer : 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) , 150 mM NaCl

Zur Bestimmung des Molekulargewichts in Lösung wurde eine analytische Gelfiltration auf einer HiLoad™ 16/60 Superdex 200 pg-Säule (120 ml SV) durchgeführt. Zur Äquilibrierung und Elution ebenso wie zur Herstellung des korrekten Probenvolumens wurde Gelfiltrationspuffer verwendet. Für die Erstellung der Eichgerade wurden 2 mg Ribonuklease A (13,7 kDa), 2 mg Carboanhydrase (29 kDa), 2 mg Conalbumin (75 kDa), 2 mg Aldolase (161 kDa) und 10 mg Catalase (250 kDa) in 500 µl Gelfiltrationspuffer verwendet. Von der CoA-Transferase wurde 1 mg Protein aufgetragen.

3.9.4 Kristallisation

Reservoirlösung: 0,1 M Magnesiumformiat Dihydrat, 15 % (w/v) PEG 3.350

Cryolösung: 15 µl Reservoirlösung + 5 µl PEG 400

Die CoA-Transferase wurde mittels Dampfdiffusionsverfahren unter Anwendung der *sitting-drop*-Technik bei 16 °C kristallisiert. Beim Ansetzen der Tropfen wurden 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoirlösung gemischt. Zum Ernten wurde der Kristall für 5 s in Cryolösung gesetzt bevor er am Goniometerkopf im Stickstoffstrom bei 100 K eingefroren wurde. Die Kristalle gehörten zu der Raumgruppe $P2_1$. Die Zellkonstanten sind Tabelle 3-2 zu entnehmen.

3.9.5 Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse

Diffractionsdaten wurden an der Synchrotronbeamline 14.2 aufgenommen (BESSY, Berlin, Deutschland). Der Kristall wurde in einem Stickstoffstrahl auf 100 K gekühlt. Die Daten wurden mit XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert.

Um initiale Phasen zu erhalten wurde die Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell mittels AutoMR in PHENIX (Adams *et al.*, 2010) durchgeführt. Als Modell diente ein Monomer des hypothetischen Proteins YfdW aus *E. coli* (PDB-Nummer: 1PT5, Sequenzidentität 26,4 %) (Gogos *et al.*, 2004), das als Mitglied der Familie III der CoA-Transferase identifiziert worden war (Gruez *et al.*, 2003). Die resultierende Elektronendichte war in beiden Fällen von guter Qualität, so dass ein erstes Modell durch RESOLVE (Terwilliger, 2003) gebaut werden konnte. Es folgte eine Verfeinerung mittels PHENIX (Adams *et al.*, 2010), in der eine *simulated annealing*-Optimierung durchgeführt wurde. Für das anschließende Bauen des Modells sowie die Verfeinerung wurden die Programme COOT (Emsley *et al.*, 2010) und PHENIX (Adams *et al.*, 2010) verwendet. Die Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Strukturüberlagerungen wurden mittels COOT (Emsley *et al.*, 2010) durchgeführt. Die Größe an Solvens-zugänglicher Oberfläche und Interaktions- bzw. Kontaktfläche wurde mit dem PISA-Server (*protein interfaces, surfaces and assemblies service*) (Krissinel & Henrick, 2007) bestimmt. Die Erstellung aller Abbildungen erfolgte mit dem Programm PYMOL (Schrodinger, 2010).

Tabelle 3-2: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik der CoA-Transferase

Datensammlung	
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁
Zellkonstanten	
<i>a</i> / <i>b</i> / <i>c</i> (Å)	58,112 / 107,971 / 62,757
α / β / γ (°)	90 / 97,160 / 90
Auflösung (Å) ^a	30-1,5 (1,60-1,50)
Einzigartige / beobachtete Reflexe ^{a,b}	122.045 / 446.815 (21.301 / 73.172)
<i>R</i> _{sym} (%) ^{a,c}	4,9 (38,9)
<i>I</i> / σ <i>I</i> ^a	15,67 (3,19)
Vollständigkeit (%) ^a	99,6 (99,0)
Monomere pro asymmetrischer	2
Einheit	

Verfeinerungsstatistik	
$R_{\text{work}} (\%)^d$	18,21
$R_{\text{free}} (\%)^e$	20,55
Anzahl der Atome	
Protein	5.848
Wasser	1.139
durchschnittlicher B -Faktor	
Protein	17,453
Wasser	28,642
root mean square (r.m.s.)- Abweichung	
Bindungslänge (Å)	0,006
Bindungswinkel (°)	1,034

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b Friedel-Partner wurden nicht als unabhängige Reflexe behandelt

^c $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_l |I_l(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_l I_l(h)$; wobei I die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes h sind.

^d $R_{\text{work}} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$

^e Der freie R -Faktor wurde aus 5 % der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

3.10 Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

Alle Arbeiten wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt (siehe 3.1).

3.10.1 Genexpression

Gepuffertes Standard I-Medium: 15 g/l Trypton/Pepton, 3 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl, 1 g/l α -D-Glucose, 15 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) (pH 7,2)

TB-Medium mit Glucose: 12 g Trypton/Pepton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml 99 % (v/v) Glycerin und 1 g α -D-Glucose wurden in 900 ml H₂O gelöst und autoklaviert. Vor dem Animpfen mit Bakterien wurden anoxisch 100 ml sterile 10x TB-Phosphatlösung zugegeben.

10x TB-Phosphatlösung: 123 g/l K₂HPO₄, 22 g/l KH₂PO₄

Anhydrotetracyclin: 2 mg/ml DMF

Carbenicillin: 50 mg/ml

Chloramphenicol: 50 mg/ml Ethanol

Waschpuffer: 50 mM MOPS (pH 7,2), 2 mM DTT

Für die Genexpression des Aktivators wurde das Plasmid pASK-IBA 3/*hadI* (Tabelle 3-1) und als Expressionsstamm *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL verwendet. Als

Expressionsmedium diente gepuffertes Standard I-Medium (Std^{MOPS}-Medium) oder TB-Medium mit Glucose (TB^{Glc}-Medium). Die Medien enthielten die Antibiotika Carbenicillin und Chloramphenicol jeweils in der Endkonzentration von 50 µg/ml.

Die Genexpression erfolgte leicht modifiziert nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2005). Das Plasmid wurde mittels Elektrotransformation in *E.coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL-Zellen eingebracht. 5 ml Medium wurden morgens mit einer Kolonie der transformierten Zellen angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C für ca. 8 Stunden aerob inkubiert. Diese Vorvorkultur wurde verwendet, um 250 ml anoxisches Medium anaerob anzuimpfen (~ 2 % (v/v)). Die Vorkultur wurde unter Rühren über Nacht bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Hauptkultur angesetzt, indem in einer 5 l-Flasche 4,75 l anaerobes Medium mit der Vorkultur anaerob angeimpft wurden (~ 5 % (v/v)). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C unter Rühren im Wasserbad. Bei einem Absorptionswert (595 nm) von circa 0,2 erfolgte die Induktion durch Zugabe von Anhydrotetracyclin in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml. Drei Stunden nach Induktion wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen geerntet, indem die Kultur in einen Handschuhkasten eingebracht und die Zellsuspension auf 500 ml-Zentrifugenbecher aufgeteilt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 6.000 x g und 4 °C. Die Zellpellets wurden nach dem Ernten der gesamten Kultur in 200 ml Waschpuffer gewaschen, vereinigt und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in ein Greinerröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Pro Expression wurden zwei oder drei 5 l-Kulturen angesetzt.

3.10.2 Proteinreinigung

Aufschlusspuffer:	50 mM MOPS (pH 7,2), 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml Lysozym, 1 mM Natriumdithionit, 2 mM DTT
Äquilibrierungspuffer:	50 mM MOPS (pH 7,2), 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 1 mM Natriumdithionit
Elutionspuffer:	50 mM MOPS (pH 7,2), 0,3 M NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 1 mM Natriumdithionit, 2,5 mM DTB

Die Reinigung beruht auf bereits publizierten Protokollen (Kim *et al.*, 2005; Locher *et al.*, 2001), wurde aber geringfügig modifiziert. Die Zellen einer Expression wurden in 50 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Dieser enthielt je nach Reinigung kein Nukleotid oder es wurde ADP bzw. das ATP-Analogon Adenosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat (ADPNP) (Yount *et al.*, 1971) in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Nach einer Inkubation von

30 min unter leichtem Rühren wurden 1 mg DNase I, 20 mM MgCl₂ sowie 1 % (v/v) Triton X-100 zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min wurde die Suspension in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und es folgte eine Ultrazentrifugation für 70 min bei 100.000 x g und 9 °C.

Der Überstand wurde auf eine 12 ml-*Strep*-Tactin-Superflow-Säule geladen, die zuvor mit 10 SV Äquilibrationpuffer äquilibriert worden war. Nach dem Beladen der Säule mit Rohextrakt wurde sie mit 10 SV Äquilibrationpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2 SV Elutionspuffer, der je nach Reinigung zusätzlich noch 1 mM Nukleotid (ADP oder ADPNP) enthalten konnte. Das gereinigte Protein wurde mittels Ultrafiltration bis zu einer Endkonzentration von 20-30 mg/ml konzentriert (VivaSpin 500, Molekulargewichtsgrenze: 30 kDa, 5.000 x g) bevor es in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und anschließend darin gelagert wurde. Da das Protein bei der Reinigung ohne Nukleotid nach dem Konzentrieren innerhalb von 30 min zu präzipitieren begann, erfolgte vor dem Aliquotieren und Einfrieren eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g.

3.10.3 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Oxidation und Reduktion

Messpuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0), 150 mM NaCl

Um den in Anwesenheit von ADP gereinigten Aktivator zu oxidieren, wurde er mit einem 10fachen molaren Überschuss an Thioninacetat und 1 mM ADP in Messpuffer in einem Endvolumen von 300 µl für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Thioninacetat mittels Pufferaustausch gegen Messpuffer über eine 4 ml-Sephadex-G25-Säule entfernt. Nach anschließender Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g wurde die Proteinlösung in eine Quarzküvette mit 1 cm Pfadlänge überführt. Ein Absorptionsspektrum im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV/Vis) wurde mittels eines Diodenarray-UV/Vis-Spektrometers aufgenommen (Integrationszeit 10 s).

Für die Reduktion wurde ein 10facher molarer Überschuss an Natriumdithionit zu der oxidierten Proteinlösung gegeben (Endvolumen 1000 µl). Nach einer Inkubation für 30 min wurde das Reduktionsmittel durch Pufferaustausch gegen Messpuffer über eine Sephadex-G25-Säule (4 ml) entfernt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 12.000 x g. Anschließend wurde die Proteinlösung in eine Quarzküvette mit 1 cm Pfadlänge überführt und ein UV/Vis-Absorptionsspektrum wurde aufgenommen.

3.10.4 Kristallisation

Der Aktivator wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels Dampfdiffusionsverfahren unter Anwendung der *hanging-drop*-Technik bei 16 °C in Anwesenheit unterschiedlicher Nukleotide kristallisiert. Vor der Kristallisation wurde das Enzym für 10 min mit 5-10 mM Natriumdithionit und dem entsprechenden Nukleotid inkubiert. Die exakte Zusammensetzung der jeweiligen Protein- und Reservoirlösung ist Tabelle 3-3 zu entnehmen. Der mit ADP gereinigte Aktivator wurde zum einen in Gegenwart von ADP kristallisiert (Kristall 1, Tabelle 3-3), zum anderen in Gegenwart von ADP und AlF_4^- (Kristall 3, Tabelle 3-3). Für die Kristallisation in Gegenwart von ADP und AlF_4^- wurden zunächst Lösungen von 500 mM NaF und 50 mM AlF_3 in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,2) hergestellt. Dann wurden diese beiden Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt, für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert und anschließend mit den anderen Komponenten zur Proteinlösung gegeben. Nachdem der Ansatz für 1 Stunde bei 16 °C inkubiert worden war, wurde die Proteinlösung mittels einer VivaSpin 500-Ultrafiltrationseinheit (Molekulargewichtsgrenze: 10 kDa) bis zu einer Proteinkonzentration von 23 mg/ml konzentriert. Für die Kristallisation in Anwesenheit von ADPNP wurde Protein aus einer Reinigung mit diesem ATP-Analogon verwendet (Kristall 2, Tabelle 3-3). Unmittelbar vor dem Ansetzen der Kristallisationstropfen wurde die Proteinlösung für 1 Minute bei 12.000 x g zentrifugiert.

Die Kristalle wurden innerhalb von 48 Stunden nach Ansetzen der Tropfen unter anoxischen Bedingungen in einem Handschuhkasten geerntet und eingefroren. Hierfür wurden sie einige Sekunden in eine Erntelösung mit Cryoschutzmittel gesetzt, bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die Zusammensetzung der Erntelösungen ist in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Darüber hinaus wurden Kristallisationsscreens mit dem Aktivator durchgeführt, der ohne Nukleotid gereinigt worden war. Dieser wurde zunächst für 10 min mit 2 mM Natriumdithionit inkubiert. Vor dem Ansetzen der Kristallisationstropfen wurde die Proteinlösung (20 mg/ml) für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert, um Präzipitat zu entfernen. Diese Kristallisationsansätze führten nicht zu Kristallen.

Tabelle 3-3: Kristallisationsbedingungen sowie Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken des reduzierten Aktivators.

	Kristall 1	Kristall 2	Kristall 3
Proteinreinigung			
anwesendes Nukleotid	ADP	ADPNP	ADP
Kristallisation			
Proteinlösung	25 mg/ml Aktivator, 50 mM MOPS (pH 7,2), 0,3 M NaCl, 1 mM ADP, 10 mM MgCl ₂ , 2,5 mM DTB, 2 mM DTT, 10 mM Natriumdithionit	21 mg/ml Aktivator, 50 mM MOPS (pH 7,2), 0,2 M NaCl, 3 mM ADPNP, 7,5 mM MgCl ₂ , 1,9 mM DTB, 1,5 mM DTT, 6 mM Natriumdithionit	23 mg/ml Aktivator, 50 mM MOPS (pH 7,2), 120 mM NaCl, 1,4 mM ADP, 9 mM MgCl ₂ , 1 mM DTB, 6 mM DTT, 1,4 mM Natrium- dithionit, 100 mM NaF, 10 mM AlF ₃
Reservoirlösung	4 M NH ₄ Acetat, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)	3,5 M NH ₄ Acetat, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,5)	8 % (w/v) PEG 8000, 25 % (v/v) MPD, 0,35 M NaCl (pH 8,5)
Tropfenzusammensetzung	2 µl + 2 µl	2 µl + 2 µl	1 µl + 1 µl
Erntelösung	3 M NH ₄ Acetat, 0,08 M Tris/HCl (pH 8,5), 1 mM Natriumdithionit, 20 % (v/v) (2R,3R)-(-)- Butan-2,3-diol	2,6 M NH ₄ Acetat, 0,08 M Tris/HCl (pH 8,5), 1 mM Natriumdithionit, 20 % (v/v) (2R,3R)-(-)- Butan-2,3-diol	7,5 % (w/v) PEG 8000, 24 % (v/v) MPD, 0,33 M NaCl (pH 8,5), 1 mM Natriumdithionit
Datensammlung			
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841	0,91841
Raumgruppe	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>I</i> 4 ₁
Zellkonstanten			
<i>a</i> / <i>b</i> / <i>c</i> (Å)	66,154 / 161,005 /	66,105 / 158,259 /	113,136 / 113,136 /
α / β / γ (°)	63,576 90 / 110,748 / 90	62,988 90 / 111,969 / 90	56,032 90 / 90 / 90
Auflösung (Å) ^a	30-1,95 (2,00-1,95)	30-1,60 (1,70-1,60)	30-3,0 (3,1-3,0)
Einzigartige / beobachtete	44.923 / 169.633	76.243 / 222.160	7.197 / 52.769
Reflexe ^{a,b}	(3.273 / 12.374)	(13.033 / 37.894)	(665 / 5.040)
<i>R</i> _{sym} (%) ^{a,c}	4,8 (50,1)	5,6 (41,1)	5,9 (48,6)
<i>I</i> / σ ^a	16,84 (2,83)	10,27 (2,74)	21,32 (4,35)
Vollständigkeit (%) ^a	99,4 (99,7)	96,7 (99,5)	99,4 (99,7)
Monomere pro asymmetrischer	2	2	1
Einheit			

Verfeinerungsstatistik			
$R_{\text{work}} (\%)^d$	17,53	17,18	17,44
$R_{\text{free}} (\%)^e$	20,26	19,58	23,63
Anzahl der Atome			
Protein	8.004	8.052	1.927
Ion / Ligand	88	90	4
Wasser	295	546	
durchschnittlicher B -Faktor			
Protein	54,535	37,555	89,115
Ion/Ligand	37,710	23,301	62,570
Wasser	46,332	41,607	
$r.m.s.$ -Abweichung			
Bindungslänge (Å)	0,009	0,012	0,008
Bindungswinkel (°)	1,406	1,692	1,128

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b Friedel-Partner wurden nicht als unabhängige Reflexe behandelt

^c $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_l |I_l(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_l I_l(h)$; wobei I die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes h sind.

^d $R_{\text{work}} = \sum_h ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$

^e Der freie R -Faktor wurde aus 5 % der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

3.10.5 Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse

Diffractionsdaten wurden an den Synchrotronbeamlines 14.1 und 14.2 aufgenommen (BESSY, Berlin, Deutschland). Der Kristall wurde in einem Stickstoffstrahl auf 100 K gekühlt. Die Daten wurden mit XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert.

Um bei den Datensätzen der Kristalle 1 und 2 initiale Phasen zu erhalten, wurde jeweils die Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell mittels PHASER (McCoy *et al.*, 2007) durchgeführt, wobei ein Monomer des oxidierten Aktivators der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* (HgdCA_F, PDB-Nummer: 1HUX) (Locher *et al.*, 2001) als Suchmodell diente. Die resultierende Elektronendichte war in beiden Fällen von guter Qualität, so dass jeweils ein erstes Modell durch RESOLVE (Terwilliger, 2003) gebaut werden konnte. Es folgte eine Verfeinerung mittels PHENIX (Adams *et al.*, 2010), in der eine *simulated annealing*-Optimierung durchgeführt wurde. Für das anschließende Bauen des jeweiligen Modells sowie die Verfeinerung wurden die Programme COOT (Emsley *et al.*, 2010) und PHENIX (Adams *et al.*, 2010) verwendet. Die Verfeinerung erfolgte mit *riding hydrogens* und jedes Monomer wurde als *translation/libration/screw* (TLS)-Gruppe behandelt. Auch bei dem Datensatz von Kristall 3 wurde für die Phasierung die Patterson-Suchmethode

mit homologem Suchmodell mittels PHASER (McCoy *et al.*, 2007) eingesetzt. Als Suchmodelle dienten die zwei Domänen eines Aktivatormonomers der Struktur des reduzierten Aktivators mit ADP (Kristall 1), wobei die C-terminale Helix Domäne I zugeordnet wurde. Somit umfasste die erste Suchdomäne die Aminosäuren 1-94 und 243-260, die zweite Suchdomäne bestand aus den Aminosäuren 95-242. Zur Minimierung des Modellbias erfolgte nun eine Verfeinerung mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.*, 2010), die eine *simulated annealing*-Energieminimierung beinhaltet. Das anschließende Bauen des Modells sowie die Verfeinerung wurde mit den Programmen COOT (Emsley *et al.*, 2010) und Phenix (Adams *et al.*, 2010) durchgeführt. Die Statistiken der Datensammlung und der Verfeinerung sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Strukturüberlagerungen wurden mittels COOT (Emsley *et al.*, 2010) oder LSQMAN (Kleywegt & Jones, 1997) durchgeführt. Kanäle wurden mit dem Programm Hollow (Ho & Gruswitz, 2008) errechnet. Die Größe an Solvens-zugänglicher Oberfläche und Interaktions- bzw. Kontaktfläche wurde stets mit dem PISA-Server (Krissinel & Henrick, 2007) bestimmt. Die Winkel, die von α -Helices eingeschlossen werden, wurden mit dem Programm Molmol (Koradi *et al.*, 1996) ermittelt. Die Erstellung aller Abbildungen erfolgte mit dem Programm PYMOL (Schrodinger, 2010).

3.10.6 Bestimmung des Redoxzustandes des Aktivators im Kristall

Um den Redoxzustand des in Gegenwart von ADP kristallisierten Aktivators zu bestimmen, wurden acht eingefrorene Aktivator-Kristalle aufgelöst und ein UV/Vis-Absorptionsspektrum der resultierenden Proteinlösung wurde aufgenommen. Hierfür wurden die Kristalle in einem Handschuhkasten zunächst aufgetaut. Anschließend wurde jeder einzelne Kristall zweimal in 5 μ l MOPS-Puffer, pH 7,0 gewaschen bevor alle zusammen in 8 μ l MOPS-Puffer (pH 7,0) aufgelöst wurden. Anschließend wurden UV/Vis-Spektren von 230-750 nm mittels eines Nanodrop-Spektrometers aufgenommen und gemittelt.

3.11 Dehydratase der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

Alle Arbeiten wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt (siehe 3.1).

3.11.1 Genexpression

Gepuffertes Standard I-Medium:	15 g/l Trypton/Pepton, 3 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl, 1 g/l α -D-Glucose, 15 mM MOPS (pH 7,2)
Carbenicillin:	50 mg/ml
Chloramphenicol:	50 mg/ml Ethanol
Anhydrotetracyclin:	2 mg/ml DMF
Waschpuffer:	50 mM MOPS (pH 7,2), 2 mM DTT

Für die Genexpression der Dehydratase wurde das Plasmid pASK-IBA 3/*hadBC* (Tabelle 3-1) verwendet, als Expressionsstamm *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL. Als Expressionsmedium wurde gepuffertes Standard I-Medium eingesetzt, das Carbenicillin (50 μ g/ml) und Chloramphenicol (50 μ g/ml) enthielt. Die Expression erfolgte analog zu der Genexpression des Aktivators (siehe Abschnitt 3.10.1), wobei 2 l-Kulturen anstatt 5 l-Kulturen angesetzt wurden.

3.11.2 Proteinreinigung

Aufschlusspuffer:	50 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM DTT, 1 mg/ml Lysozym
Puffer A:	50 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM DTT
Puffer B:	50 mM MOPS (pH 7,0), 1 M NaCl, 2 mM DTT
Puffer C:	50 mM MOPS (pH 7,0), 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM DTT
Puffer D:	50 mM MOPS (pH 7,0), 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM DTT

Die Reinigung der Dehydratase erfolgte leicht modifiziert nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2005). Die Zellen einer Expression (3-10 g) wurden in 50 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Nachdem die Zellsuspension für 30 min unter Rühren inkubiert worden war, folgten die Zugabe von 1 mg DNase I, dann der Zellaufschluss mittels Sonifizierung an einem Branson Sonifier (Mikrospitze, *duty cycle*: 55 %, *output control*: 5) und schließlich eine Ultrazentrifugation für 70 min bei 100.000 x g und 9 °C.

Der Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Sepharose FastFlow-Säule (50 ml SV) geladen. Die Säule wurde mit 2 SV Puffer A gewaschen bevor die Elution mit einem linearen Gradient von Puffer A nach Puffer B über 10 SV erfolgte. Die Fraktionen, die Dehydratase enthielten, wurden vereinigt, 2fach mit Puffer C verdünnt und auf eine mit Puffer D äquilibrierte Phenyl-Sepharose 6 FastFlow-Säule (30 ml SV) geladen. Auf das

Waschen der Säule mit 2 SV Puffer D folgte die Elution mit einem linearen Gradient von Puffer D nach Puffer A über 10 SV. Dehydratase enthaltende Fraktionen wurden wieder vereinigt und 3fach mit Puffer A verdünnt. Eine mit Puffer A äquilibrierte Source 30Q-Säule (30 ml SV) wurde mit der Proteinlösung beladen. Für das Waschen wurden 2 SV Puffer A verwendet und für die Elution wiederum ein linearer Gradient von Puffer A nach Puffer B über 10 SV verwendet. Die Dehydratase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und es folgte ein Pufferaustausch gegen Puffer A mittels einer Sephadex G25-Säule. Schließlich wurde das gereinigte Protein mit einer VivaCell 70-Ultrafiltrationseinheit (Molekulargewichtsgrenze: 50 kDa) bei 1.000 x g und 4 °C bis zu einer Endkonzentration von 20-40 mg/ml konzentriert bevor es in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und gelagert wurde.

3.11.3 UV/Vis-spektroskopische Charakterisierung der Dehydratase

UV/Vis-Absorptionsspektren der Dehydratase wurden in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 2 mM DTT aufgenommen. Die Messung erfolgte entweder in einer 1 cm-Quarzküvette mit einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer (Integrationszeit 10 s) oder mit einem Nanodrop-Spektrometer.

3.11.4 Rekonstitution

Rekonstitutionspuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM DTT

Eine Rekonstitution der Dehydratase wurde nur durchgeführt, sofern im UV/Vis-Absorptionsspektrum das Verhältnis von A_{410} zu $A_{280} < 0,18$ war. Für die Rekonstitution wurden 17 nmol Dehydratase mit je 22 nmol Li_2S und Ammonium-Eisen-Citrat in 200 μl Rekonstitutionspuffer für 1-4 Stunden inkubiert. Das molare Verhältnis von Li_2S / Ammonium-Eisen-Citrat zu Dehydratase basierte auf der Annahme, dass 70-85 % der Dehydratase vollständige [4Fe-4S]-Zentren enthält. Anschließend erfolgte ein Pufferaustausch mittels einer 4 ml-Sephadex G25-Säule gegen Rekonstitutionspuffer.

3.11.5 Synthese von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA

Die Synthese von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA erfolgte nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2008), wobei (R)-2-Hydroxyisocaproat als Ausgangssubstanz diente. 110 μmol (R)-2-Hydroxyisocaproat wurden mit einer äquimolaren Menge 1,1'-Carbonyldiimidazol in 500 μl Tetrahydrofuran gelöst (Lösung A). Gleichzeitig wurden 10 μmol CoA in 500 μl 0,1 M NaHCO_3 gelöst. 200 μl Lösung A wurden anschließend zu Lösung B gegeben. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M

HCl bis zu einem pH-Wert von 2 gestoppt. Die Reinigung des Esters erfolgte mittels einer 4 ml-Sep-Pak C₁₈-Säule, die mit 1 SV Methanol gewaschen und mit 5 SV 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert worden war. Nach dem Beladen der Säule mit dem Reaktionsansatz wurde sie mit 3 SV 0,1 % (v/v) TFA gewaschen. Für die Elution wurde 50 % (v/v) Acetonitril in 0,1 % (v/v) TFA verwendet. Das gereinigte Produkt wurde lyophilisiert und aufgrund der Stabilität der Esterbindung maximal drei Monate bei -30 °C gelagert. Für die Herstellung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Lösungen wurde der Feststoff in Wasser oder Puffer gelöst und die Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt ($\epsilon_{260} = 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.11.6 Aktivitätsmessung

Die Aktivität der Dehydratase wurde mittels eines kontinuierlichen und direkten Aktivitätstests gemessen (Kim *et al.*, 2005). Dieser basiert auf dem Unterschied der Extinktionskoeffizienten von (*R*)-2-Hydroxyisocapoyl-CoA und (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA bei 290 nm ($\Delta\epsilon = 2,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Zunächst wurde die Dehydratase in einer 1 cm-Quarzküvette für fünf Minuten mit einer äquimolaren Menge Aktivator in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 0,1 mM Natriumdithionit in einem Gesamtvolumen von 500 µl inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,4 mM (*R*)-2-Hydroxyisocapoyl-CoA gestartet und es wurde die Absorptionzunahme bei 290 nm mit einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer verfolgt.

3.11.7 Reduktion der Dehydratase

Messpuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0), 100 mM NaCl

Reduktion mittels Aktivator. Die Dehydratase kann durch den Aktivator reduziert werden (Kim *et al.*, 2005). Hierzu wurden in einer 1 cm Quarzküvette 34 µM Dehydratase, 5 mM DTT, 1 mM Natriumdithionit, 5 mM MgCl₂ und 1 mM ATP in Messpuffer in einem Endvolumen von 500 µl vorgelegt. Die Reduktion wurde durch die Zugabe von 0,4 µM Aktivator gestartet. Jede Minute wurde ein UV/Vis-Absorptionsspektrum an einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer aufgenommen (Integrationszeit 10 s). Die Absorptionsspektren wurden basierend auf der Absorption bei 800 nm korrigiert.

Photoreduktion. Die Photoreduktion erfolgte nach Massey *et al.* (Massey *et al.*, 1978), wobei ein Deazaflavinderivat (Kaliumsalz von 5-Deaza-10-methyl-3-sulfopropylisoalloxazin) als Photoreduktionsmittel diente. Der Reaktionsansatz enthielt 34 µM Dehydratase, 1 µM Methylviologen und 2,6 µM Deazaflavinderivat in Messpuffer in einem Endvolumen von

500 µl. Als Elektronendonator war in der Lösung entweder 5 mM Glycin oder 10 mM Dinatriumoxalat enthalten. Die Reduktion wurde durch Belichtung mit einer Halogentaschenlampe in einer 1 cm-Quarzküvette durchgeführt und alle zwei Minuten wurde ein UV/Vis-Absorptionsspektrum an einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer aufgenommen (Integrationszeit 10 s). Die Absorptionsspektren wurden basierend auf der Absorption bei 800 nm korrigiert.

Um die Aktivität der reduzierten Dehydratase zu untersuchen, wurden nach vollständiger Reduktion 2 mM (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA zugegeben und die Absorptionszunahme bei 290 nm wurde beobachtet (vgl. Abschnitt 3.11.6). Eine Reoxidation der reduzierten Dehydratase durch die Zugabe von Thioninacetat oder $K_3Fe(III)(CN)_6$ bis zu äquimolaren Mengen war nicht erfolgreich.

3.11.8 Kristallisation

Reservoirlösung: 18-29 % (w/v) PEG 3.350, 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 6,5)

Proteinlösung: 20-28 mg/ml Dehydratase in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 2 mM DTT

Cryolösung: 18-29 % (w/v) PEG 3.350, 25 % (v/v) PEG 400, 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 6,5)

soaking-Lösung: 20 % (w/v) PEG 3.350, 25 % (w/v) PEG 400, 3,8 mM (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA, 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 6,5)

Die Dehydratase wurde mittels Dampfdiffusionsverfahren unter Anwendung der *hanging-drop*- und der *sitting-drop*-Technik bei 16 °C unter anoxischen Bedingungen kristallisiert. Das Verhältnis von Reservoir- zu Proteinlösung betrug stets 1:1, das finale Tropfenvolumen variierte zwischen 2 und 4 µl. Unmittelbar vor dem Einfrieren wurden die Kristalle für circa 5 s in Cryolösung gesetzt. Für das *soaking* von Dehydratasekristallen mit Substrat wurden die Kristalle für 30 min in 20 µl *soaking*-Lösung gesetzt, bevor sie anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert wurden.

Weiterhin wurde die Dehydratase kokristallisiert, indem sie vor dem Ansetzen der Tropfen für 10 min mit 5 mM (*R*)-2-Hydroxyisocaproat inkubiert worden war. Die Reservoir- bzw. Cryolösung entsprach jeweils derjenigen, die auch für die Dehydratase allein verwendet wurde.

3.11.9 Datensammlung, Strukturlösung und Strukturanalyse

Alle Diffraktionsdaten wurden an der Synchrotronbeamline BL14.2 (BESSY, Berlin, Deutschland) aufgenommen. Der Kristall wurde in einem Stickstoffstrahl auf 100 K gekühlt. Die Daten wurden mit XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert.

Da keine homologe Struktur bekannt war, wurde die *multiple wavelength anomalous*

dispersion (MAD)-Technik verwendet, wobei die Eisenatome der Fe/S-Zentren als anomale Streuer dienten. In dem entsprechenden Datensatz konnten mit dem Programm SHELX (Sheldrick, 2008) zunächst vier [4Fe-4S]-Zentren lokalisiert und mit SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997) Phasen berechnet werden. Nachdem die 16 Eisenatome manuell positioniert worden waren, erfolgte Neuberechnung der Phasen mit SHARP. Die resultierende Elektronendichte besaß eine gute Qualität, so dass ein erstes Modell mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 1999) gebaut werden konnte. Anschließend wurde das Modell abwechselnd mit dem Programm COOT (Emsley *et al.*, 2010) überbaut und mit CNS (Brunger *et al.*, 1998), REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) bzw. PHENIX (Adams *et al.*, 2010) verfeinert. Bei der Verfeinerung wurden *riding hydrogens* verwendet und jede Untereinheit bildete eine TLS-Gruppe. Die Bindungslänge der terminalen Liganden zu dem besonderen Eisenatom wurden mit schwachen *restraints* verfeinert. Der Besetzungsgrad des Wasserliganden und des besonderen Eisenatoms wurden basierend auf den *B*-Faktoren der anderen Atome des α -[4Fe-4S]-Zentrums abgeschätzt. Die Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 3-4 aufgeführt. Zur Detektion von Schwefelatomen wurde ein weiterer Datensatz bei einer Wellenlänge von 1,76 Å aufgenommen (Datensammlungsstatistik siehe Tabelle 3-5).

Initiale Phasen der Dehydratase mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproat bzw. (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA wurden mittels Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell erhalten, wobei das verfeinerte Modell der Dehydratase als Suchmodell diente. Bei jedem Modell wurde anschließend eine erste Verfeinerung mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) durchgeführt, die eine *simulated-annealing*-Optimierung enthielt. Für das folgende Überbauen und Verfeinern der Modelle wurden die Programme COOT (Emsley *et al.*, 2010), CNS (Brunger *et al.*, 1998) und PHENIX (Adams *et al.*, 2010) verwendet. Der Besetzungsgrad von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA und (*R*)-2-Hydroxyisocaproat wurde mit Hilfe der *B*-Faktoren des jeweiligen Liganden selbst sowie denen des α -[4Fe-4S]-Zentrums abgeschätzt. Die Bindungslänge zwischen dem Carbonylsauerstoffatom des Thioesters des Substrates und dem besonderen Eisenatom des α -Zentrums bzw. zwischen dem Carboxylatsauerstoffatom von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat und dem besonderen Eisenatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums wurde mit kleinen Kraftkonstanten verfeinert. Die Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 3-6 aufgeführt.

Tabelle 3-4: Statistiken der Datensammlung (MAD) und Verfeinerung der Dehydratase

Datensatz	Fe(<i>peak</i>)	Fe(<i>inflection-point</i>)	Fe(<i>native</i>)
Datensammlung			
Wellenlänge (Å)	1,73980	1,74203	0,91841
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Zellkonstanten			
$a / b / c$ (Å)	69,847 / 127,509 /	69,953 / 127,609 /	70,764 / 129,192 /
$\alpha / \beta / \gamma$ (°)	177,111	177,381	179,166
	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å) ^a	30-2,10 (2,20-2,10)	30-2,10 (2,20-2,10)	30-1,82 (1,90-1,82)
einzigartige /	174.525 / 349.864	175.146 / 349.124	146.208 / 573.460
beobachtete Reflexe	(21.902 / 38.728) ^{a,b}	(21.632 / 37.526) ^{a,b}	(17.400 / 61.781) ^{a,c}
R_{sym} (%) ^{a,d}	4,7 (24,0)	4,8 (27,1)	6,3 (47,4)
$I/\sigma I^a$	11,84 (3,20)	10,85 (2,68)	12,52 (2,71)
Vollständigkeit (%) ^a	97,8 (94,2)	97,8 (92,7)	99,1 (98,5)
Heterodimere pro	2	2	2
asymmetrischer			
Einheit			
Verfeinerungsstatistik			
R_{work} (%) ^e			17,32
R_{free} (%) ^f			22,04
Anzahl der Atome			
Protein			24.896
Ion / Ligand			44
Wasser			1.693
durchschnittlicher B -			
Faktor			
Protein			34,574
Ion/Ligand			29,657
Wasser			37,149
$r.m.s.$ -Abweichung			
Bindungslänge (Å)			0,007
Bindungswinkel (°)			1,898
PDB-Nummer			3O3M

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben^b Friedel-Partner wurden als unabhängige Reflexe behandelt^c Friedel-Partner wurden nicht als unabhängige Reflexe behandelt^d $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$; wobei I die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes h sind.^e $R_{\text{work}} = \sum_h \|F_{\text{obs}} - |F_{\text{calc}}|\| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$ ^f Der freie R -Faktor wurde aus 5 % der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Tabelle 3-5: Statistik der Datensammlung für die Schwefeldetektion bei der Dehydratase

Wellenlänge (Å)	1,76
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Zellkonstanten	
$a / b / c$ (Å)	70,351 / 128,167 / 177,725
$\alpha / \beta / \gamma$ (°)	90, 90, 90
Auflösung (Å) ^a	30-1,90 (2,00-1,90)
einzigartige / beobachtete Reflexe ^{a,b}	237.274 / 819.291 (31.360 / 81.452)
R_{sym} (%) ^{a,c}	5,6 (24,8)
$I/\sigma I$ ^a	13,91 (3,42)
Vollständigkeit (%) ^a	97,0 (90,0)

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b Friedel-Partner wurden als unabhängige Reflexe behandelt

^c $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_l |I_l(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_l I_l(h)$; wobei I die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes h sind.

Tabelle 3-6: Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung der Dehydratase mit gebundenem (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA und (R)-2-Hydroxyisocaproat

	Dehydratase mit (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA	Dehydratase mit (R)-2-Hydroxyisocaproat
Datensammlung		
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Zellkonstanten		
$a / b / c$ (Å)	70,648 / 126,683 / 177,699	65,31 / 85,58 / 149,51
$\alpha / \beta / \gamma$ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å) ^a	30-2,30 (2,40-2,30)	30-2,00 (2,10-2,00)
einzigartige / beobachtete Reflexe ^{a,b}	71.258 / 556.261	55.143 / 200.353
	(8.260 / 50.596)	(6.839 / 16.659)
R_{sym} (%) ^{a,c}	9,4 (45,3)	9,0 (27,7)
$I/\sigma I$ ^a	14,40 (3,76)	9,25 (3,04)
Vollständigkeit (%) ^a	99,4 (98,8)	96,0 (88,9)
Heterodimere pro asymmetrischer Einheit	2	1
Verfeinerungsstatistik		
R_{work} (%) ^d	21,10	20,38
R_{free} (%) ^c	27,25	25,71
Anzahl der Atome		
Protein	12.299	6.146
Ion / Ligand	146	26
Wasser	1.206	766

durchschnittlicher <i>B</i> -Faktor		
Protein	35,286	24,986
Ion/Ligand	68,320	26,091
Wasser	38,807	30,495
<i>r.m.s.</i> -Abweichung		
Bindungslänge (Å)	0,007	0,01
Bindungswinkel (°)	1,569	1,347
PDB-Nummer	3O3N	3O3O

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b Friedel-Partner wurden nicht als unabhängige Reflexe behandelt

^c $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$; wobei *I* die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes *h* sind.

^d $R_{\text{work}} = \sum_h \|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}\| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$

^e Der freie *R*-Faktor wurde aus 5 % der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Strukturüberlagerungen wurden mittels COOT (Emsley *et al.*, 2010) oder LSQMAN (Kleywegt & Jones, 1997) durchgeführt. Kanäle wurden mit dem Programm Hollow (Ho & Gruswitz, 2008) errechnet. Die Größe an Solvens-zugänglicher Oberfläche und Interaktions- bzw. Kontaktfläche wurde stets mit dem PISA-Server (Krissinel & Henrick, 2007) bestimmt. Die Koordinationsänderung des Substrates am α -[4Fe-4S]-Zentrum wurde mit COOT (Emsley *et al.*, 2010) modelliert, die anschließende Energieminimierung wurde mittels CNS (Brunger *et al.*, 1998) durchgeführt. Die Erstellung aller Abbildungen erfolgte mit dem Programm PYMOL (Schrodinger, 2010).

3.12 Komplexbildung des Aktivators und der Dehydratase

3.12.1 Ansatz und Reinigung des Komplexes

Komplexbildungspuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0)

Waschpuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM Natriumdithionit

Die Komplexbildung erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). Insgesamt wurden drei Varianten des Komplexbildungsansatzes verwendet, die sich in dem im Ansatz enthaltenen Nukleotid unterschieden. Generell wurden der Aktivator und die Dehydratase im molaren Verhältnis von 1:3, 1:2 oder 1:1 in einem Endvolumen von 500 µl in Komplexbildungspuffer mit 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 5 mM Natriumdithionit gemischt. Im Ansatz lag die Konzentration der Dehydratase stets im Bereich von 50 und 100 µM.

Bei Variante 1 war im Ansatz zusätzlich 1 mM ADPNP enthalten und es wurde der Aktivator eingesetzt, der in Gegenwart von ADPNP gereinigt worden war. Bei Variante 2 wurde der Aktivator aus der Reinigung mit ADP verwendet. Für die Komplexbildung waren im Ansatz außerdem 2 mM ADP, 100 mM NaF und 10 mM AlF_3 enthalten. Die Stammlösungen von NaF (500 mM) und AlF_3 (50 mM) wurden zunächst im Verhältnis 1:1 gemischt und dann zum Komplexbildungsansatz gegeben. Auch bei Variante 3 wurde der in Gegenwart von ADP gereinigte Aktivator eingesetzt. Der Komplexbildungsansatz enthielt 2 mM ADP und 10 mM Na_3VO_4 . Die Na_3VO_4 -Stammlösung (272 mM) wurde nach Goodno (Goodno, 1979) vor Verwendung frisch hergestellt.

Nach einer Inkubation von 60 min wurde eventuell auftretendes Präzipitat durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde für die Charakterisierung mittels analytischer Gelfiltration verwendet.

Für die Kristallisationsansätze wurden nicht im Komplex gebundene Einzelkomponenten durch Ultrafiltration bis zu einem Endvolumen von circa 100 μl in einer Microcon-Zentrifugations-Filtereinheit (Molekulargewichtsgrenze: 100 kDa) abgetrennt (5.000 x g). Die Proteinlösung wurde nun entweder direkt verwendet oder aber der Komplex wurde weiter gereinigt. Hierfür wurden 150 μl Waschpuffer hinzugefügt und die Proteinlösung wurde erneut bis zu einem Volumen $\leq 100 \mu\text{l}$ ultrafiltriert. Diese Schritte wurden zwei weitere Male wiederholt.

3.12.2 Analytische Gelfiltration

Gelfiltrationspuffer: 50 mM MOPS (pH 7,0), 150 mM NaCl, 2 mM DTT

Für die Analyse der Komplexbildung wurde eine analytische Gelfiltration auf einer HiLoadTM 16/60 Superdex 200 pg-Säule (120 ml SV) durchgeführt. Zur Äquilibration und Elution ebenso wie zur Herstellung des korrekten Probenvolumens wurde Gelfiltrationspuffer verwendet. Für die Erstellung der Eichgerade wurden 1 mg Ribonuklease A (13,7 kDa), 1 mg Ovalbumin (43 kDa), 1 mg Conalbumin (75 kDa), 1 mg Lactat-Dehydrogenase (140 kDa) und 5 mg Catalase (240 kDa) in 500 μl Gelfiltrationspuffer verwendet. Von dem Aktivator, der Dehydratase und dem Komplex wurden stets 1 mg Protein aufgetragen. Charakterisiert wurden die Komplexe, die mit ADPNP bzw. ADP und AlF_4^- angesetzt worden waren. Als Kontrolle wurde ein Komplexbildungsansatz hergestellt, der nur 1 mM ADP enthielt.

3.12.3 Kristallisation

Die Kristallisation des Komplexes erfolgte mittels Dampfdiffusionsverfahren unter Anwendung der *sitting-drop*-Technik bei 16 °C unter anoxischen Bedingungen. Das Verhältnis von Reservoir- zu Proteinlösung betrug stets 1:1, das finale Tropfenvolumen 0,6 µl. Kristallisationsexperimente wurden mit den Komplexansätzen durchgeführt, die ADPNP enthielten, ADP und AlF_4^- oder ADP und VO_4^{3-} . Die verwendeten kommerziellen Screens und sowie die Bedingungen, unter denen Kristalle erhalten wurden, sind in Tabelle 9-1 aufgelistet. Unmittelbar vor dem Einfrieren wurden die Kristalle für 5 s in Cryolösung gesetzt. Die Cryolösung setzte sich aus 16 µl Reservoirlösung und 4 µl (2*R*,3*R*)-(-)-Butan-2,3-diol zusammen bzw. 17 µl Reservoirlösung und 3 µl (2*R*,3*R*)-(-)-Butan-2,3-diol, sofern PEG in der Reservoirlösung enthalten war.

3.12.4 Datensammlung, Strukturlösung und Charakterisierung der Kristalle

Röntgenbeugungsexperimente wurden entweder an den Synchrotronbeamlines 14.1 bzw. 14.2 (BESSY, Berlin, Deutschland) oder an einem Diffraktometer mit Mikrofokusröntgenröhre und einem *image plate*-Detektor durchgeführt. Die Kristalle wurden in einem Stickstoffstrahl auf 100 K gekühlt. Sofern eine Indizierung möglich war, wurde diese mit iMOSFLM oder ipMOSFLM durchgeführt (Leslie, 1992).

Ein Kristall (Kristall 48) beugte Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von circa 2,5 Å, so dass ein vollständiger Datensatz aufgenommen wurde. Die Daten wurden mit XDS (Kabsch, 1993) prozessiert und skaliert. Aufgrund des Matthews-Koeffizienten war es unwahrscheinlich, dass sich der Komplex in der asymmetrischen Einheit befand. Um initiale Phasen zu erhalten wurde die Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell mittels PHASER {McCoy, 2007 #70} durchgeführt. Als Suchmodelle dienten die zwei Domänen eines Aktivatormonomers der Struktur des reduzierten Aktivators mit ADP (vgl. Abschnitt 3.10.5), wobei die C-terminale Helix Domäne I zugeordnet wurde. Somit umfasste die erste Suchdomäne die Aminosäuren 1-94 und 243-260, die zweite Suchdomäne bestand aus den Aminosäuren 95-242. Zur Minimierung des Modellbias erfolgte nun eine Verfeinerung mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.*, 2010), die eine *simulated annealing*-Energieminimierung beinhaltete. Das anschließende Bauen des Modells sowie die Verfeinerung wurde mit den Programmen COOT (Emsley *et al.*, 2010) und Phenix (Adams *et al.*, 2010) durchgeführt. Bei der Verfeinerung bildete jedes Monomer eine TLS-Gruppe. Die Statistiken der Datensammlung und der Verfeinerung sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

Tabelle 3-7: Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistik des Komplexkristalls 48.

Datensammlung	
Wellenlänge (Å)	0,91841
Raumgruppe	$P 4_1$
Zellkonstanten	
$a / b / c$ (Å)	99,728 / 99,728 / 57,561
$\alpha / \beta / \gamma$ (°)	90 / 90 / 90
Auflösung (Å) ^a	30-2,45 (2,50-2,45)
Einzigartige / beobachtete Reflexe ^{a,b}	20.983 / 156.108 (1.231 / 9.247)
R_{sym} (%) ^{a,c}	6,6 (50,6)
$I/\sigma I$ ^a	20,04 (4,27)
Vollständigkeit (%) ^a	99,8 (100,0)
Monomere pro asymmetrischer Einheit	2
Verfeinerungsstatistik	
R_{work} (%) ^d	19,12
R_{free} (%) ^e	25,34
Anzahl der Atome	
Protein	3.834
Ligand	8
Wasser	85
durchschnittlicher B -Faktor	
Protein	49,061
Ligand	34,481
Wasser	46,964
$r.m.s.$ -Abweichung	
Bindungslänge (Å)	0,008
Bindungswinkel (°)	1,105

^a Die Werte für die höchste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben

^b Friedel-Partner wurden nicht als unabhängige Reflexe behandelt

^c $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_l |I_l(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_l I_l(h)$; wobei I die unabhängigen Beobachtungen des Reflexes h sind.

^d $R_{\text{work}} = \sum_h \|F_{\text{obs}} - |F_{\text{calc}}|\| / \sum_h |F_{\text{obs}}|$

^e Der freie R -Faktor wurde aus 5 % der Daten errechnet, die zufällig ausgewählt und vor der Strukturverfeinerung entfernt worden waren.

Um die Proteinkomponenten zu identifizieren, die sich in einem Kristall befanden, wurde jeder eingefrorene Kristall nach dem Röntgenbeugungsexperiment in einem anaeroben Handschuhkasten aufgetaut, in 5 µl bidestilliertem Wasser gewaschen und schließlich in 5 µl bidestilliertem Wasser aufgelöst. Die resultierenden Proteinlösungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Die (E)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase

4.1.1 Genexpression, Proteinreinigung und Charakterisierung

Die Genexpression erfolgte heterolog in *E. coli* BL21(DE3). Die Ausbeute betrug circa 5,8 g Nasszellgewicht pro Liter Zellkultur. Bei der erstmaligen Charakterisierung der CoA-Transferase durch Kim *et al.* wurde das C-terminale *Strep-tag* II-Peptid dazu verwendet, das Enzym mittels einstufiger Affinitätschromatographie zu reinigen (Kim *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden vor der Affinitätschromatographie zwei weitere Chromatographieschritte durchgeführt, so dass die Reinheit auf über 95 % erhöht werden konnte. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 2,3 mg pro Gramm Nasszellgewicht. Das Monomer besitzt ein theoretisches Molekulargewicht (Gasteiger *et al.*, 2003) von 45,4 kDa (399 Aminosäuren zuzüglich 10 Aminosäuren für die Verbindungssequenz und das *Strep-tag* II –Peptid). Die analytische Gelfiltration ergab für die CoA-Transferase in Lösung ein Molekulargewicht von 85 kDa, was einem Homodimer entspricht (theoretischer Wert (Gasteiger *et al.*, 2003): 90,9 kDa)

4.1.2 Die Struktur der CoA-Transferase

Die Struktur der CoA-Transferase konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden, wobei die Phasierung mit der Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell erfolgte. Die Auflösung beträgt 1,50 Å.

Dimerstruktur. In der Patterson-Suche wurden zwei Monomere pro asymmetrischer Einheit gefunden, was bereits durch die Berechnung des Matthews-Koeffizienten angedeutet worden war. Diese sind über eine zweizählige Symmetrie miteinander verbunden. Das Dimer hat eine Ausdehnung von $90 \times 90 \times 50 \text{ Å}^3$ und weist eine Solvens-zugängliche Oberfläche von 28.930 Å^2 auf. Weiterhin besitzt es eine ungewöhnliche Faltung, bei der sich die beiden Monomere wie zwei ineinander hängende Ringe umeinander winden und miteinander verkettet sind (Abbildung 4-1). Hieraus ergibt sich mit 5.766 Å^2 eine große Interaktionsfläche. Diese Fläche errechnet sich als Differenz der Solvens-zugänglichen Oberfläche der isolierten und der im Dimer befindlichen Monomere, dividiert durch zwei. An der Dimerkontaktfläche sind von jedem Monomer 146 Aminosäuren beteiligt, die eine Vielzahl von nicht-kovalenten Wechselwirkungen ausbilden.

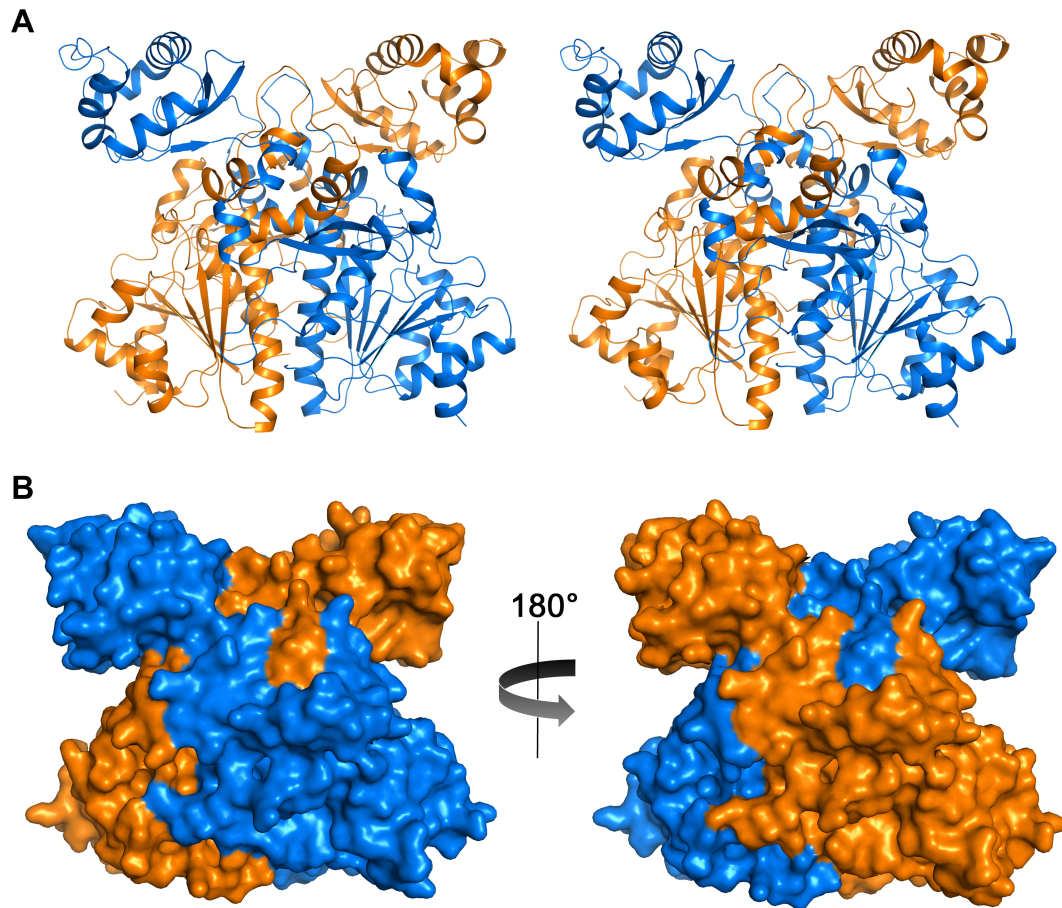


Abbildung 4-1: Struktur der (E)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase. (A) Stereoabbildung des Homodimers. Die Monomere sind in der Bänderdarstellung in blau und orange gezeigt. (B) Oberflächendarstellung des Homodimers. Die Farben sind wie in (A).

Topologie eines Monomers. Ein Monomer besteht aus einer großen Domäne (Aminosäuren 1-225 und 318-399) und einer kleinen Domäne (Aminosäuren 226-317), die jeweils eine gemischte α/β -Topologie aufweisen (Abbildung 4-2). Insgesamt umfasst das Monomer 18 α -Helices und elf β -Stränge. Letztere sind in drei β -Faltblättern angeordnet. Ein paralleles, sechsträngiges β -Faltblatt bildet den Kern der großen Domäne und ist von α -Helices umgeben. Ein zweisträngiges, antiparalleles Faltblatt befindet sich ebenfalls in der großen Domäne und bildet mit einer α -Helix das C-terminale Ende. Die kleine Domäne besteht aus einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt und einigen α -Helices. Lange *loop*-Bereiche mit kurzen α -helikalen Abschnitten, die der großen Domäne zugeordnet wurden, verbinden die Domänen und stellen gleichzeitig den Bereich dar, in dem sich die Monomere umeinander herumwinden. Die Monomere sind sich sehr ähnlich und die Überlagerung ergibt für korrespondierende C_{α} -Atome eine *r.m.s.*-Abweichung von 0,26 Å.

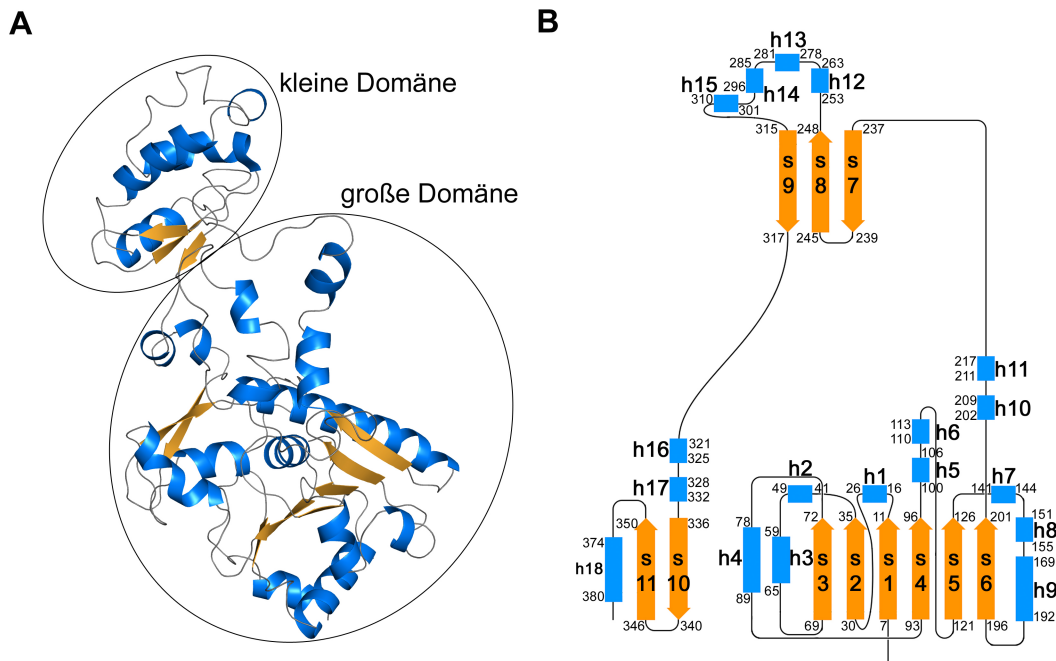


Abbildung 4-2: Topologie eines Monomers der CoA-Transferase. (A) Bänderdarstellung des Monomers, wobei α -Helices blau, β -Stränge orange und loops grau eingefärbt sind. (B) Schema der Anordnung der Sekundärstrukturelemente. α -Helices (blau) sind von h1-h18 nummeriert, β -Stränge (orange) von s1-s11. Loops sind in schwarz eingezeichnet. Die Zahlen geben die Nummer der Aminosäure am Anfang bzw. Ende eines Sekundärstrukturelements an.

4.2 Der Aktivator der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

4.2.1 Genexpression, Proteinreinigung und Charakterisierung

Die Genexpression erfolgte heterolog in *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RIL unter anoxischen Bedingungen in Std^{MOPS}- oder TB^{Glc}-Medium basierend auf einem publizierten Protokoll (Kim *et al.*, 2005). Die Ausbeute einer 5 l-Kultur betrug durchschnittlich 2,7 g Nasszellgewicht.

Für eine Reinigung wurden in der Regel die Zellen von zwei 5 l-Kulturen verwendet. Aufgrund des C-terminalen *Strep-tag* II-Peptides wurde die Reinigung mittels Affinitätschromatographie basierend auf den Protokollen von Kim *et al.* und Locher *et al.* durchgeführt (Kim *et al.*, 2005); (Locher *et al.*, 2001). Da der Aktivator in der reduzierten Form am stabilsten ist (AG Prof. Dr. W. Buckel, Philipps-Universität Marburg, persönliche Kommunikation), fand die Reinigung stets unter reduzierenden Bedingungen statt. Entweder war während der gesamten Reinigung kein Nukleotid anwesend oder aber ADP bzw. ADPNP wurde während dem Zellaufschluss und der Elution zugefügt. In Abbildung 4-3 A ist zu

erkennen, dass der in Gegenwart von ADP gereinigte Aktivator eine Reinheit von mehr als 95 % aufwies. Die Größe eines Aktivatormonomers konnte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf 31 kDa abgeschätzt werden, was mit dem theoretischen Wert {Gasteiger, 2003 #161} von 29,6 kDa (266 Aminosäuren des Proteins zuzüglich 10 Aminosäuren für die Verbindungssequenz und das *Strep-tag II* –Peptid) übereinstimmt. Wurde ADPNP in der Reinigung verwendet, führte dies zu einer vergleichbaren Reinheit. Die Ausbeute für den in Gegenwart eines Nukleotids gereinigten Aktivator betrug zwischen 2,2 und 4,4 mg Protein pro Gramm Nasszellgewicht.

Erfolgte die Reinigung ohne Nukleotid, so war die Reinheit deutlich geringer (Abbildung 4-3 B), ebenso wie die Ausbeute. Letztere betrug 0,9 mg Protein pro Gramm Nasszellgewicht. Außerdem wies das Protein eine geringere Stabilität auf und begann innerhalb von 30 min nach Beendigung der Reinigung zu präzipitieren.

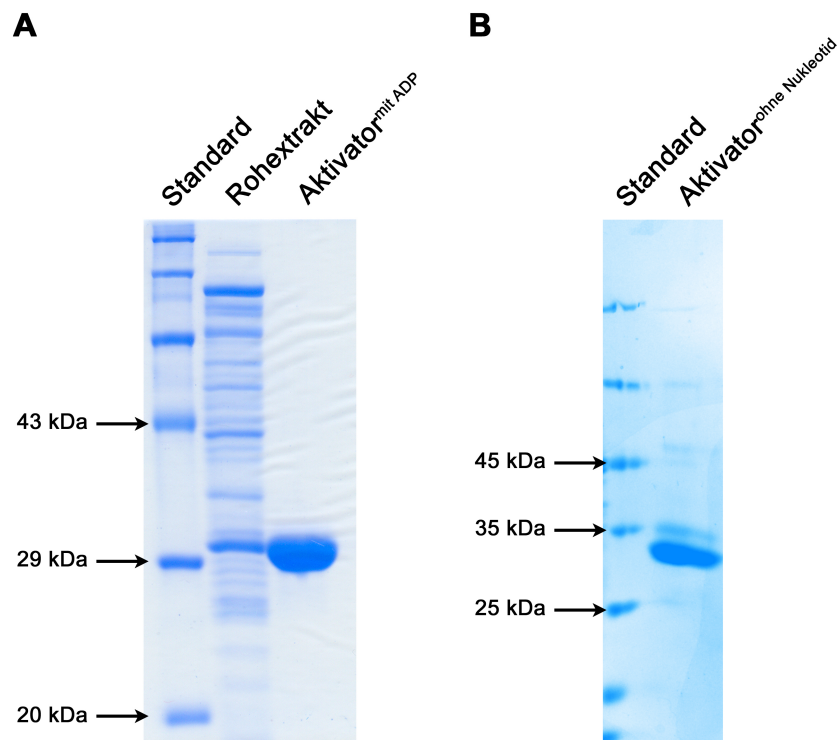


Abbildung 4-3: Reinigung des Aktivators. Gezeigt sind Bilder von 12 %igen Polyacrylamidgelen, die mit Coomassieblau gefärbt wurden. (A) Reinigung des Aktivators mit ADP. Von dem Rohextrakt und dem gereinigten Aktivator wurden je 15 µg Protein aufgetragen. Als Standard wurde der Roti®-Standard der Firma Roth (T851.1) verwendet (10 µl). (B) Reinigung des Aktivators ohne Nukleotid. Von dem Aktivator wurden 7 µg aufgetragen. Als Standard wurde der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas (SM0431) verwendet (10 µl).

Die analytische Gelfiltration hat gezeigt, dass der Aktivator als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 72 kDa vorliegt (vgl. Abschnitt 3.12.2, theoretischer Wert (Gasteiger *et al.*, 2003): 59,2 kDa). Das Elutionsvolumen war außerdem unabhängig davon, ob der

Aktivator in Gegenwart von ADP oder ADPNP gereinigt worden war.

4.2.2 Oxidation und Reduktion des Aktivators

Um spektrale Unterschiede zwischen dem oxidierten und reduzierten Aktivator zu untersuchen, wurden die beiden Zustände mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie charakterisiert. Abbildung 4-4 zeigt die Spektren des oxidierten und reduzierten Aktivators. Das Spektrum des oxidierten Aktivators weist eine ausgeprägte Schulter bei 400 nm auf, sowie eine leichte Schulter bei 320 nm. Bei dem Spektrum des reduzierten Aktivators ist ein Maximum bei 360 nm zu finden.

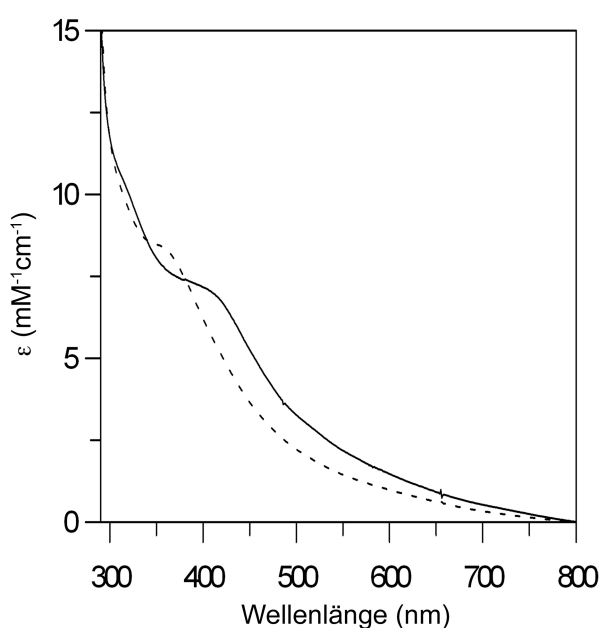


Abbildung 4-4: Oxidation und Reduktion des Aktivators. Gezeigt sind die UV/Vis-Absorptionsspektren des oxidierten (—) und des reduzierten (---) Aktivators. Die Oxidation erfolgte mit 10fachem molaren Überschuss Thioninacetat, die Reduktion mit 10fachem molaren Überschuss Natriumdithionit in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,2) mit 150 mM NaCl. Das Oxidations- bzw. Reduktionsmittel wurde jeweils durch Pufferaustausch mittels einer Sephadex G25-Säule entfernt.

4.2.3 Kristallisation des Aktivators

Bei der Kristallisation des Aktivators in Gegenwart von ADP, ADP und AlF_4^- sowie ADPNP sind braun gefärbte Kristalle innerhalb von 12 bis 48 Stunden nach Ansetzen der Tropfen gewachsen (Abbildung 4-5). Die Größe betrug 0,1-0,4 mm. In der Erntelösung waren die Kristalle optisch stabil.

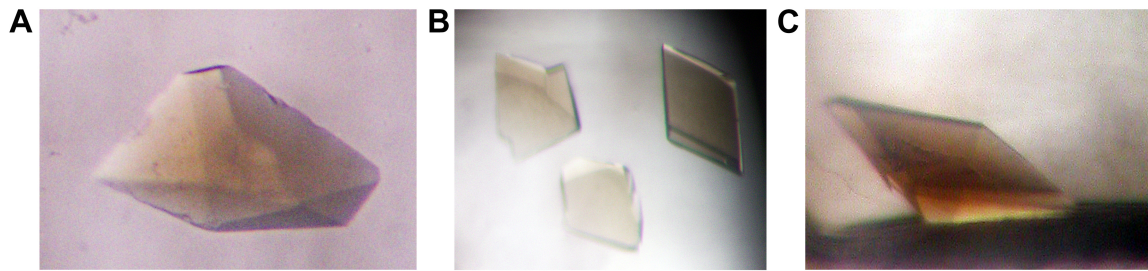


Abbildung 4-5: Kristalle des Aktivators. Der Aktivator wurde unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von (A) ADP, (B) ADP und AlF_4^- und (C) ADPNP kristallisiert. Die Zusammensetzung der jeweiligen Protein- und Reservoirlösung ist in **Tabelle 3-3** aufgeführt.

Die Kristallisation des reduzierten Aktivators ohne Nukleotid war nicht erfolgreich. Während der Inkubation mit Natriumdithionit sowie während dem Ansetzen der Tropfen kam es zur Präzipitation, was auf eine verringerte Stabilität des Proteins hindeutet.

4.2.4 Die Struktur des Aktivators mit gebundenem ADP

Der Aktivator wurde unter reduzierenden Bedingungen in der Gegenwart von ADP kristallisiert und seine Struktur konnte mittels der Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell bestimmt werden. Die Auflösung beträgt $1,95 \text{ \AA}$.

Dimerstruktur. In der Patterson-Suche wurden zwei Monomere pro asymmetrischer Einheit gefunden, die über eine zweizählige Rotationsachse miteinander verbunden sind (Abbildung 4-6). Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten hatte bereits das Vorliegen des Dimers in der asymmetrischen Einheit nahegelegt. Das Dimer misst $40 \times 65 \times 100 \text{ \AA}^3$ und weist eine Solvens-zugängliche Oberfläche von 23.150 \AA^2 auf.

Jedes der Monomere besitzt eine Nukleotidbindungsstelle, wobei in diesem Fall ADP gebunden ist. Die beiden Monomere sind im Wesentlichen identisch und korrespondierende C_α -Atome haben eine *r.m.s.*-Abweichung von $0,49 \text{ \AA}$. An der Dimerkontaktfläche befindet sich das funktional wichtige $[4\text{Fe-4S}]$ -Zentrum, direkt auf der zweizähligen Rotationsachse. Es verbindet die beiden Monomere miteinander, weshalb es als „verbrückendes Zentrum“ bezeichnet wird. Vernachlässigt man das Zentrum, so beträgt die Dimerkontaktfläche 447 \AA^2 . Diese Fläche errechnet sich als Differenz der Solvens-zugänglichen Oberfläche der isolierten und der im Dimer befindlichen Monomere, dividiert durch zwei. Insgesamt umfasst die Dimerkontaktfläche 13 Reste von jedem Monomer, wobei nur wenige Interaktionen beobachtet werden können. Zum einen befindet sich die Hydroxygruppe von Ser170 von Monomer A in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zur Guanidiniumgruppe von Arg131 von

Monomer B. Zum anderen interagiert Phe167 von Monomer A mit den Hauptkettenatomen von Cys125 und Ala126 von Monomer B. Die gleichen Interaktionen gelten für Ser170 und Phe167 von Monomer B mit Monomer A.

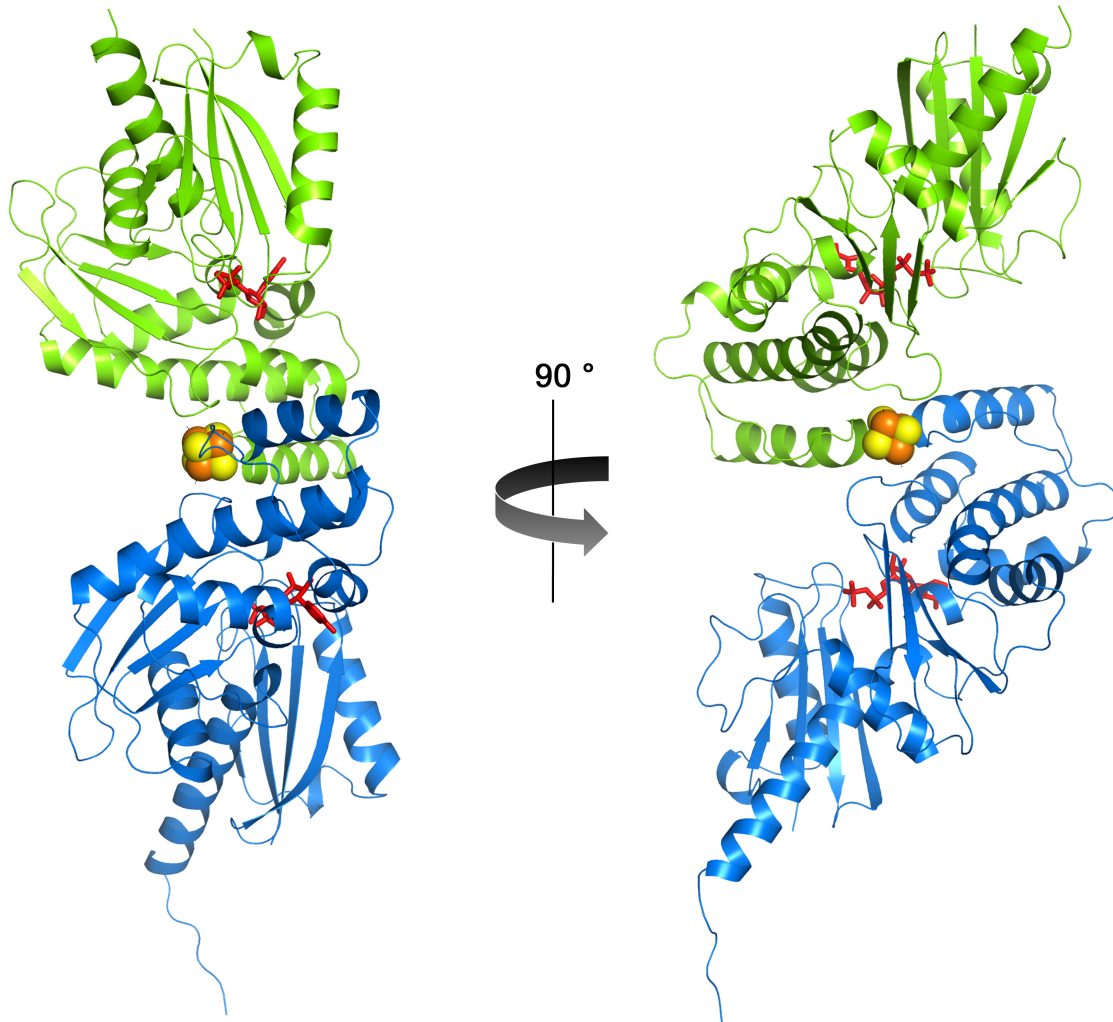


Abbildung 4-6: Bänderdarstellung des Aktivators. Die Monomere sind in blau und grün gezeigt, ADP als Stäbchenmodell in rot und das [4Fe-4S]-Zentrum als Kugelmodell, wobei Eisenatome orange und Schwefelatome gelb gefärbt sind. Die Monomere sind über eine zweizählige Rotationsachse verbunden, die durch das Fe/S-Zentrum verläuft.

Topologie eines Monomers. Insgesamt umfasst ein Monomer acht α -Helices sowie zehn β -Stränge, wobei letztere in zwei β -Faltblättern zu je fünf β -Strängen angeordnet sind. Ein Monomer lässt sich in zwei Domänen aufteilen, die ein „L“ bilden (Abbildung 4-7). Domäne I umfasst die Aminosäuren 1-91 und Domäne II beinhaltet die Reste 92 -278. Darüber hinaus lässt sich Domäne II in die Subdomänen IIa und IIb aufteilen. Je ein β -Faltblatt ist in Domäne I und Domäne II zu finden, wobei die Abfolge und Richtung der β -Stränge sowie die Anordnung der verbindenden *loops* in beiden β -Faltblättern nahezu identisch ist. Der Hauptunterschied zwischen den Domänen I und II besteht in der Subdomäne

IIb. Sie umfasst 4 α -Helices (Helices 3-6), die zu einem Bündel angeordnet sind. An der zu Subdomäne IIb korrespondierenden Position in Domäne I befindet sich nur eine einzelne Helix (Helix 1). Die β -Stränge s6-s10 sowie die α -Helices h7 und h8 bilden die Subdomäne IIa. Die β -Faltblätter schließen einen Winkel von circa 60° ein. Zwischen ihnen sind zwei nahezu orthogonal zueinander stehende α -Helices positioniert, die jeweils das C-terminale Ende einer Domäne darstellen (h2 und h8). Aufgrund ihrer Lage könnte man h2 und h8 auch jeweils der anderen Domäne zuordnen. Diese zwei α -Helices stellen außerdem die Verbindung der Domänen I und II dar. Die Nukleotidbindungsstelle befindet sich im Spalt zwischen den beiden β -Faltblättern, dort wo die Domänen aneinander stoßen.

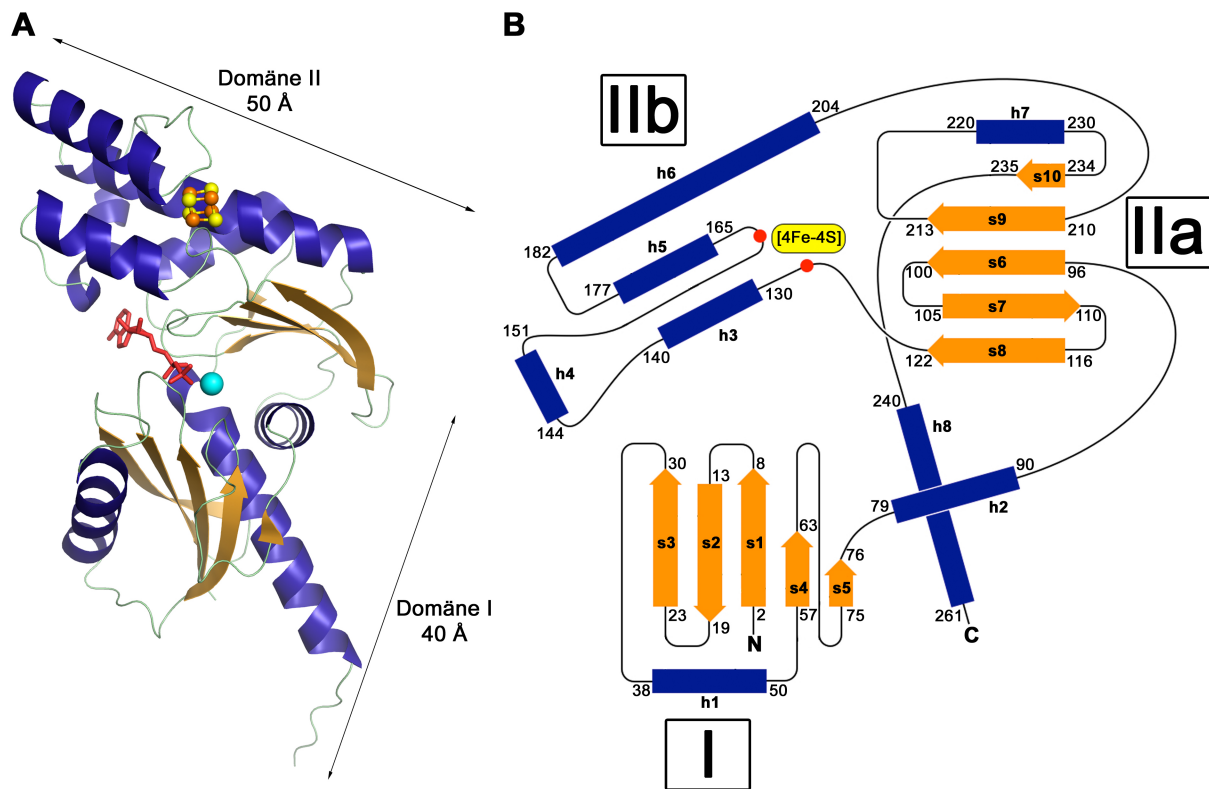


Abbildung 4-7: Topologie eines Aktivatormonomers mit gebundenem ADP. (A) Bänderdarstellung eines Monomers, wobei α -Helices in blau, β -Stränge in dunkelgelb und *loops* in grün gezeigt sind. Das ADP-Molekül ist als Stäbchenmodell in rot dargestellt, das Magnesiumion als cyanfarbene Kugel. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugel- und Stäbchenmodell gezeigt, wobei Eisenatome orange und Schwefelatome gelb sind. (B) Schema der Anordnung der Sekundärstrukturelemente. α -Helices (blau) sind von h1 bis h8 und β -Stränge (orange) sind von s1 bis s10 nummeriert. Loops sind in schwarz gezeichnet. Die roten Punkte repräsentieren die zwei Cysteine, die das [4Fe-4S]-Zentrum koordinieren. Die Zahlen geben die Nummer der Aminosäure am N- bzw. C-terminalen Ende eines Sekundärstrukturelements an.

Aufgrund seiner Topologie gehört der Aktivator zur Actin-Faltungsfamilie, deren Mitglieder alle die Actin-Faltung (Hurley, 1996; Kabsch & Holmes, 1995) besitzen und von der man

annimmt, dass sie sich aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt hat (Bork *et al.*, 1992; Buss *et al.*, 2001; Flaherty *et al.*, 1991). Unter der Actin-Faltung versteht man zwei fast symmetrische Domänen, die jeweils die Topologie $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ aufweisen, wobei die verbindenden *loops* variabel gestaltet sein können. Diese zwei Domänen bilden den Kern des jeweiligen Proteins und können weitere Domänen unterstützen, die in *loop*-Bereichen inseriert sind. Diese zwei Kerndomänen sind im Fall des Aktivators Domäne I und Subdomäne IIa. Namensgebender und wohl prominentester Vertreter dieser Faltungsfamilie ist das Protein Actin (Kabsch *et al.*, 1990; Schuler, 2001). Weiterhin gehören hinzu Hexokinase (Anderson *et al.*, 1978), Glycerinkinase (Hurley *et al.*, 1993) sowie einige weitere Zuckerkinasen, die 70 kDa-Hitzeschockproteine (Hsp70) (Bork *et al.*, 1992; Gaut & Hendershot, 1993; Itoh *et al.*, 1999), die Actin-verwandten Proteine (*actin related proteins*, ARPs) (Schafer & Schroer, 1999; Schroer *et al.*, 1994), mehrere Phosphatasen (Reizer *et al.*, 1993) und Histonproteine (Tarkka *et al.*, 1995). Beispiele in Prokaryoten sind das Zellteilungsprotein FtsA (Sanchez *et al.*, 1994; van den Ent & Lowe, 2000), das Zellzyklusprotein MreB und das Plasmidstabilitätsprotein StbA (Bork *et al.*, 1992). All diese Proteine weisen nur geringe Sequenzidentitäten auf und werden oftmals auch als ASKHA-Familie (*acetate and sugar kinases/Hsc70/actin*) bezeichnet (Buss *et al.*, 2001). Die Durchsuchung der Proteindatenbank mit DaliLite v.3 (Holm *et al.*, 2008) ergab, dass das Enzym Pantothenatkinase mit gebundenem ATP-Analogon ADPNP (PDB-Nummer: 2EWS) (Hong *et al.*, 2006) dem ADP-gebundenen Aktivatormonomer strukturell am ähnlichsten ist (*r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C α -Atome: 2,91 Å), gefolgt von verschiedenen Vertretern der Actin-Faltungsfamilie.

ADP-Bindungsstelle. In jedem Monomer ist im Spalt zwischen den beiden β -Faltblättern ein ADP-Molekül nicht-kovalent gebunden (Abbildung 4-7). Abbildung 4-8A zeigt die Aminosäuren, die an der ADP-Bindung beteiligt sind. Der Adeninteil von ADP wird zum einen von Arg218 und Gly215 sowie von einigen Wassermolekülen koordiniert. Interaktionspartner des Riboseteils sind Asp134, Gly214, Gly215 und Val216, wobei Asp134 so orientiert ist, dass die Carboxylatgruppe in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu den beiden vicinalen Hydroxygruppen ist. Das α -Phosphat wird von Gly215 und Gln241 koordiniert, das β -Phosphat von Thr11 und von Ala12. Darüber hinaus interagiert Gly102 mit dem Sauerstoffatom, das das α - mit dem β -Phosphat verbindet. Der N-Stickstoff von Lys14 befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zum α - sowie zum β -Phosphat.

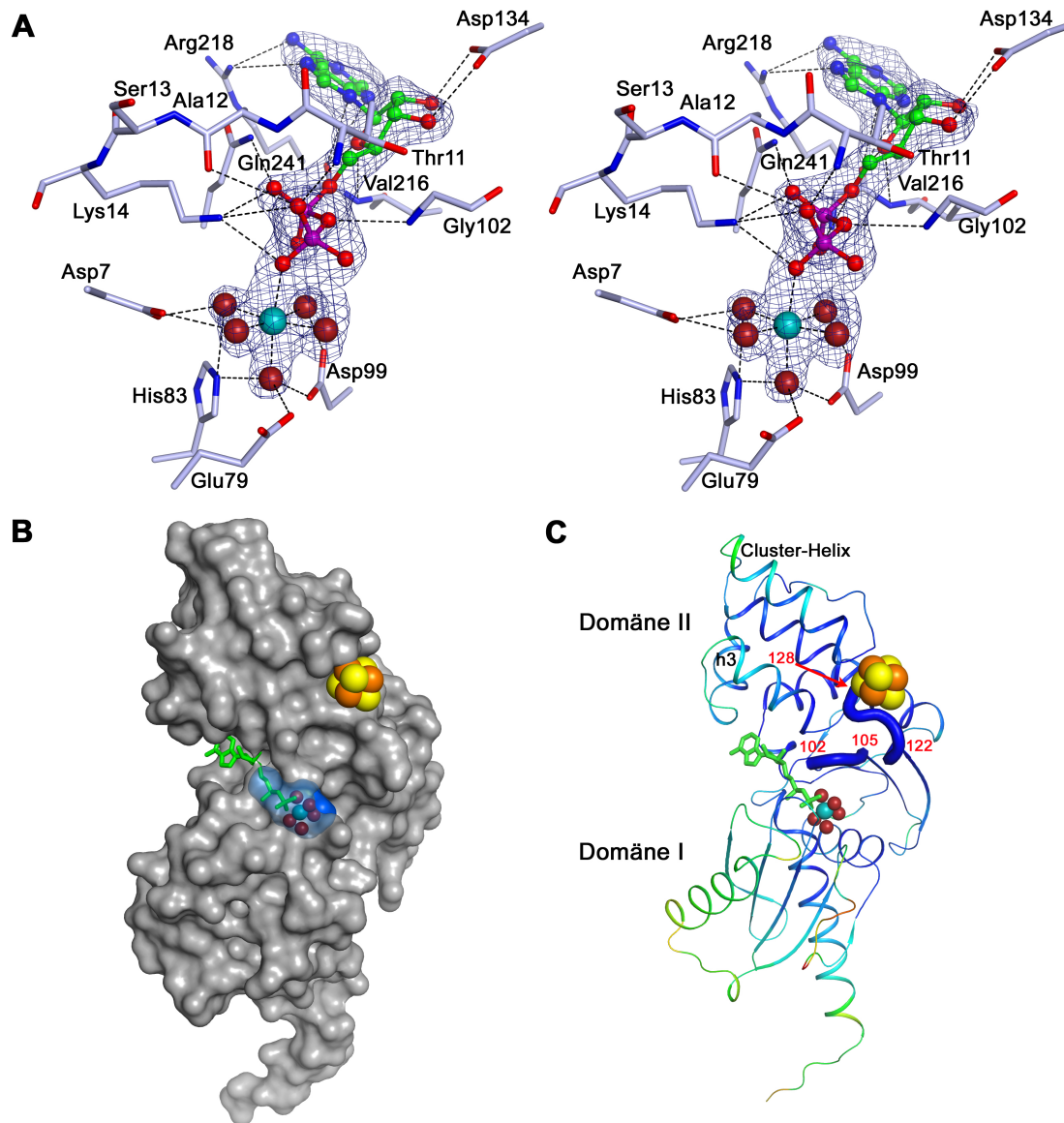


Abbildung 4-8: Bindung von ADP im Aktivator. (A) Stereoabbildung der ADP-Bindungsstelle. Das Nukleotid ist als Kugel- und Stäbchenmodell dargestellt, koordinierende Reste als Stäbchenmodell, wobei Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau und Phosphoratome violett gezeigt sind. Kohlenstoffatome der Aminosäuren sind grau, Kohlenstoffatome des Nukleotids grün. Wassermoleküle sowie das Magnesiumion sind als dunkelrote bzw. cyanfarbene Kugeln dargestellt. Die *simulated-annealing omit map* ist in dunkelblau gezeigter Kontur (Level 3 σ). Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze, unterbrochene Linien gezeigt. (B) Oberflächendarstellung des Aktivatormonomers. ADP ist als Stäbchenmodell in lila gezeigt, Wassermoleküle und das Magnesiumion als rote bzw. cyanfarbene Kugeln. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugelmodell dargestellt (Eisenatome sind orange, Schwefelatome gelb). Der Kanal, in dem sich das α - und β -Phosphat sowie das Magnesiumion und die Wassermoleküle befinden, ist in blau dargestellt. (C) Bänderdarstellung des Aktivatormonomers, nach steigendem B -Faktor der C_α -Atome von blau über grün und gelb bis rot gefärbt. ADP, das Fe/S-Zentrum, Mg^{2+} und die Wassermoleküle sind wie in (B) dargestellt. Die *loop*-Bereiche, die den Phosphatteil von ADP mit dem Fe/S-Zentrum verbinden, sind hervorgehoben, wobei die Zahlen den Nummern der Aminosäuren am Anfang bzw. Ende eines Bereichs entsprechen.

Des Weiteren ist ein zusätzlicher Interaktionspartner zu finden, der das β -Phosphat

koordiniert. Die Modellierung dieses Liganden als Mg^{2+} -Ion passt zum einen zu den Elektronendichtekarten und dem Ergebnis der Verfeinerung, zum anderen besitzt er insgesamt 6 Koordinationspartner (das β -Phosphat sowie fünf Wassermoleküle), die oktaedrisch in einer durchschnittlichen Entfernung von 2,2 Å angeordnet sind. Diese Distanzen liegen im Bereich der durchschnittlichen Mg^{2+} -Sauerstoff-Distanz von 2,08 Å, die in Strukturen von kleinen Molekülen mit oktaedrisch koordiniertem Mg^{2+} -Ion beobachtet wurde (Glusker, 1991). Die das Mg^{2+} -Ion koordinierenden Wassermoleküle befinden sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu weiteren Aminosäuren (Asp7, Glu79, His83 und Asp99), so dass das Mg^{2+} -Ion indirekt vom Protein gebunden ist. Die Bindungsstelle für den Phosphatteil des Nukleotids besteht aus den Bereichen, die jeweils den ersten und zweiten β -Strang jeder Kerndomäne miteinander verbinden (s1 und s2 bzw. s6 und s7). In Domäne I sind dies die Reste 7-11 (Asp-Ile-Gly-Ser-Thr), in Domäne II sind es die Reste 99-103 (Asp-Ile-Gly-Gly-Gln). Das Ergebnis der Verfeinerung sowie die Qualität der Elektronendichtekarten lassen darauf schließen, dass die Besetzung von MgADP in beiden Monomeren 100 % beträgt.

Die zwei Phosphatgruppen sowie das Magnesiumion und die davon koordinierten Wassermoleküle sind in einem Kanal positioniert, der durch das Protein führt und eine Länge von etwa 8 Å besitzt (Abbildung 4-8B). Der Adenosylrest interagiert zwar mit dem Protein, befindet sich jedoch außerhalb des Kanals. Das β -Phosphat befindet sich etwa 17 Å vom [4Fe-4S]-Zentrum entfernt und wird mit ihm durch die *loop*-Bereiche verbunden, die die Aminosäuren 102-105 und 122-128 umfassen (Abbildung 4-8C). In letzterem Bereich ist auch Cys125 lokalisiert, das direkt das Fe/S-Zentrum koordiniert.

Die Umgebung des [4Fe-4S]-Zentrums. Der Aktivator besitzt ein [4Fe-4S]-Zentrum, das die beiden Monomere verbrückt (Abbildung 4-6). Es wird von vier Cysteinresten koordiniert, je zwei von jedem Monomer (Abbildung 4-9). Cys125 befindet sich im *loop* zwischen s8 und h3, Cys164 ist am N-terminalen Ende von h5 lokalisiert (Abbildung 4-7 B). Weitere Interaktionen zwischen Atomen des Fe/S-Zentrums und Aminosäuren existieren nicht.

Das Zentrum sitzt am N-terminalen Ende von h5, direkt auf der Verlängerung der Helixachse, weshalb diese als Cluster-Helix bezeichnet wird (Locher *et al.*, 2001). Eine Analyse des Aktivators mit dem PISA-Server (Krissinel & Henrick, 2007) ergab, dass die beiden Monomere ohne das Zentrum kein stabiles Dimer bilden können. Das [4Fe-4S]-Zentrum kann zusammen mit den Cluster-Helices der beiden Monomere als zentrale Einheit des Dimers betrachtet werden, wobei die Helices einen Winkel von 95,6 ° einschließen, den so genannten

Helix-Cluster-Helix-Winkel (Abbildung 4-6).

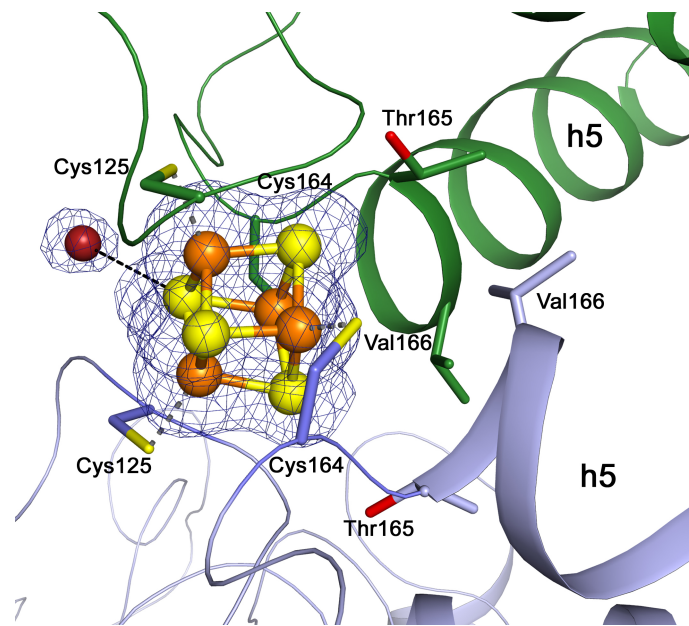


Abbildung 4-9: Koordinierung des verbrückenden [4Fe-4S]-Zentrums. Das Fe/S-Zentrum ist als Kugel- und Stäbchenmodell gezeigt, ausgewählte Aminosäuren als Stäbchenmodell und das Wassermolekül als Kugel. Die Monomere sind als Bändermodell in den Farben grün und blau dargestellt. Kohlenstoffatome sind in den Farben des entsprechenden Monomers, Schwefelatome sind in gelb, Eisenatome in orange und Sauerstoffatome in rot gezeigt. Thr165 und Val166 der beiden Monomere bilden ein Viereck, das das Fe/S-Zentrum vom Lösungsmittel abschirmt. Die Cluster-Helix ist mit h5 bezeichnet. Die *simulated-annealing omit map* ist in dunkelblau gezeigt (Konturlevel 3 σ). Wasserstoffbrückenbindungen und koordinative Bindungen sind als schwarz bzw. grau gestrichelte Linien dargestellt.

B- oder Temperaturfaktoren können als Maß für die Beweglichkeit von Atomen verstanden werden. Betrachtet man die *B*-Faktoren der C_α-Atome in einem Monomer, so fällt auf, dass diese insbesondere in den Domänen IIa (ohne h8) und IIb niedrig sind (Abbildung 4-8), d.h. diese Bereiche sind wenig beweglich. Lediglich die C-terminalen Enden der Cluster-Helix und von Helix 3 sind etwas beweglicher. Die C_α-Atome in Domäne I weisen durchschnittlich höhere *B*-Faktoren auf als diejenigen in Domäne II, mit Ausnahme der Bereiche, die an der Nukleotidbindung beteiligt sind.

Thr165 und Val166 liegen am N-terminalen Ende der Cluster-Helix und bilden im Dimer direkt über dem Fe/S-Zentrum ein Viereck (Abbildung 4-9). Hierdurch ist das Fe/S-Zentrum auf dieser Seite von dem Lösungsmittel abgeschildert (Abbildung 4-10). Diese Seite des Proteins wird als Oberseite des Aktivators bezeichnet (Locher *et al.*, 2001). Die gegenüberliegende Seite des Fe/S-Zentrums ist zugänglich für das Lösungsmittel und in der Struktur ist an dieser Stelle ein Wassermolekül zu finden, das sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu einem der Schwefelatome des Fe/S-Zentrums befindet (Abbildung 4-9).

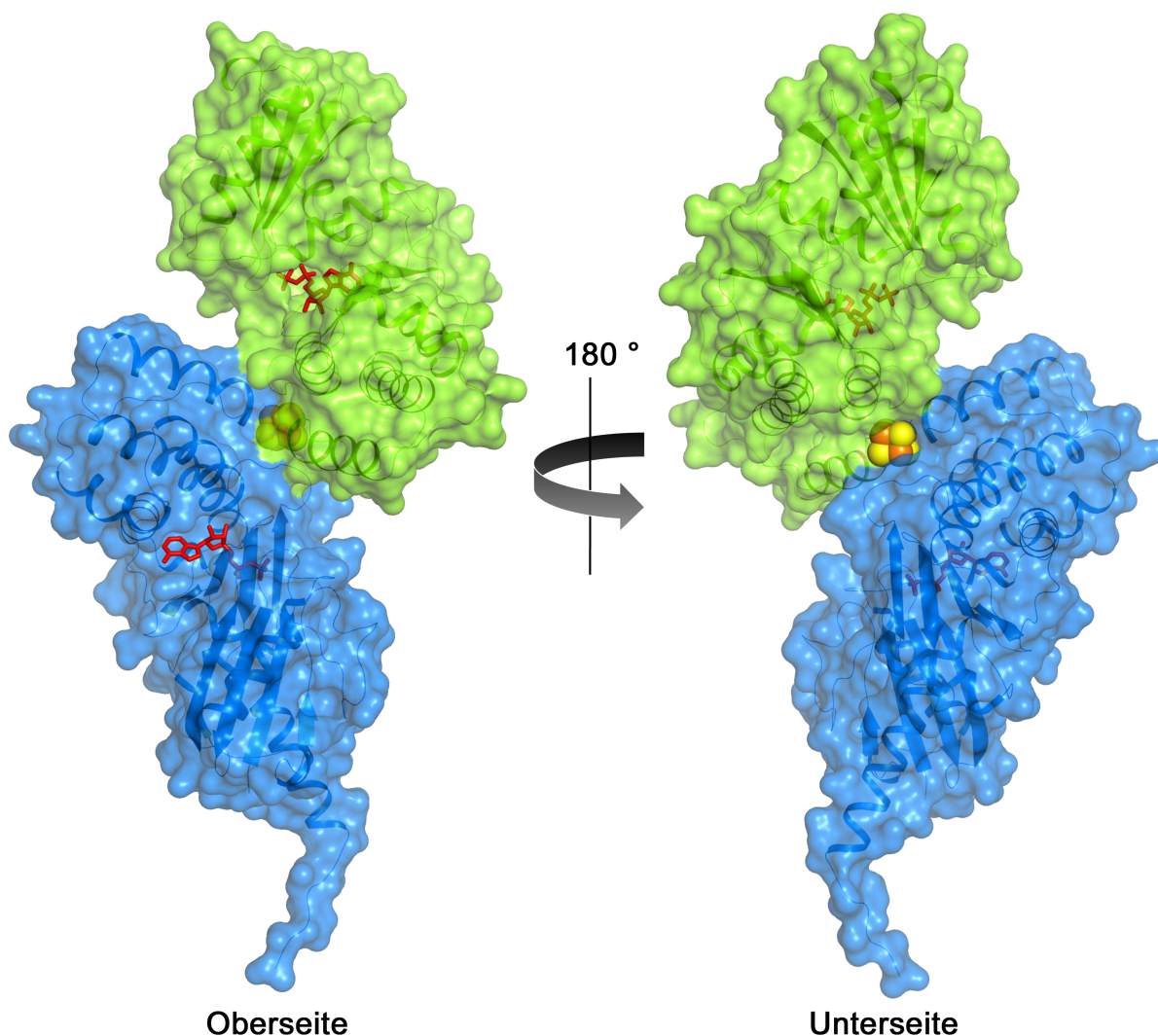


Abbildung 4-10: Solvenz zugänglichkeit des [4Fe-4S]-Zentrums. Die Monomere sind sowohl in der Bänder- als auch der Oberflächendarstellung in grün und blau gezeigt. ADP ist als Stäbchenmodell in rot dargestellt und das [4Fe-4S]-Zentrum als Kugelmodell, wobei Eisenatome orange und Schwefelatome gelb sind.

Redoxzustand. Um den Redoxzustand des Aktivators im Kristall zu bestimmen, wurden Kristalle des ADP-gebundenen Aktivators in Puffer aufgelöst und von der resultierenden Proteinlösung wurde ein Spektrum aufgenommen. Dieses ist einschließlich der Spektren des reduzierten und oxidierten Aktivators (vgl. Abschnitt 4.2.2) in Abbildung 4-11 gezeigt.

Das Spektrum der aufgelösten Kristalle weist ein Maximum bei 370 nm auf und ähnelt dem Spektrum des reduzierten Aktivators. Folglich ist anzunehmen, dass sich der Aktivator in den gefrorenen Kristallen im reduzierten Zustand befand. Hierfür spricht auch, dass die Kristalle maximal 48 Stunden nach dem Ansetzen der Kristallisationstropfen eingefroren wurden und Natriumdithionit über mehrere Tage stabil ist. Dies bedeutet, dass die diskutierte Struktur derjenigen des reduzierten Aktivators mit gebundenem ADP entspricht (Aktivator^{red,ADP}).

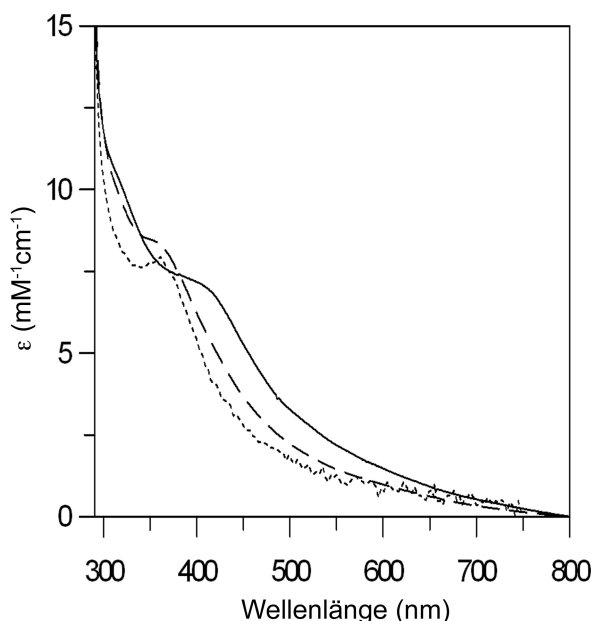


Abbildung 4-11: UV/Vis-Spektren des Aktivators mit gebundenem ADP. Gezeigt sind die Spektren des oxidierten (—) und reduzierten Aktivators (- - - -)(vgl. Abschnitt 4.2.2) sowie das der Proteinlösung der in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) aufgelösten Kristalle (.....).

Bei der Kristallisation des Aktivators in Gegenwart von ADPNP und $\text{ADP}^*\text{AlF}_4^-$ sowie dem Einfrieren der entsprechenden Kristalle wurde wie bei dem Aktivator^{red,ADP} verfahren. Unter der Voraussetzung, dass die gebundenen Nukleotide keinen größeren Einfluss auf das Redoxpotenzial des $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrums haben, kann davon ausgegangen werden kann, dass der Aktivator in allen Fällen reduziert war und die Strukturen somit stets den reduzierten Zustand beschreiben.

4.2.5 Die Struktur des Aktivators mit gebundenem ADPNP

Gesamtstruktur und Topologie. Die Kristalle des Aktivators, der in Gegenwart von ADPNP kristallisiert worden war, gehören zu der Raumgruppe $C2$, wie auch die Kristalle des Aktivators^{red,ADP}. Auch die Kristallisationsbedingungen sowie die Zellkonstanten der Kristalle der zwei Aktivatorformen sind sehr ähnlich (Tabelle 3-3). Wie bei dem Aktivator^{red,ADP} befinden sich auch hier zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit, die über eine zweizählige Rotationsachse verbunden sind und durch ein $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum verbrückt werden (Abbildung 4-12). Die Struktur wurde bis zu einer Auflösung von $1,6 \text{ \AA}$ verfeinert. Das Dimer hat in etwa die Dimensionen $40 \times 65 \times 100 \text{ \AA}^3$ mit einer Solvens-zugänglichen Oberfläche von 23.540 \AA^2 und – unter Vernachlässigung des $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrums – einer Dimerkontaktfläche von 505 \AA^2 . Die Interaktionen zwischen den Monomeren sind wie bei

dem Aktivator^{red,ADP}.

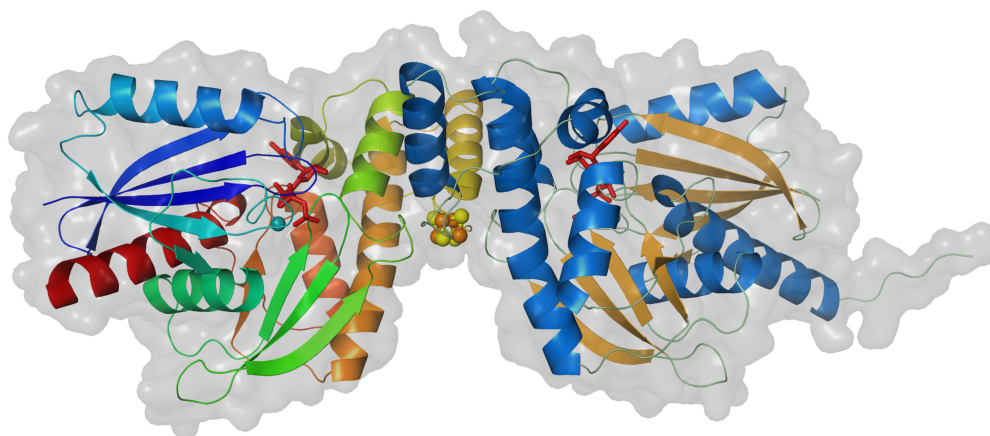


Abbildung 4-12: Bänderdarstellung des Aktivators mit gebundenem ADPNP. Das rechte Monomer ist entsprechend seiner Sekundärstruktur gefärbt (α -Helices in blau, β -Stränge in gelb und *loops* in grün). Das linke Monomer ist in Regenbogenfarben gezeigt, wobei der N-Terminus blau ist und der C-Terminus rot. Die Nukleotide sind als Stäbchenmodell in rot dargestellt. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugel- und Stäbchenmodell und die Magnesiumionen als Kugelmodell gezeigt, wobei Eisenatome orange, Schwefelatome gelb und Magnesiumionen cyan gefärbt sind. Die Oberfläche ist in grau dargestellt.

Jedes Monomer besteht aus acht α -Helices und zehn β -Strängen und weist im Wesentlichen die gleiche Topologie auf wie ein Aktivator^{red,ADP}-Monomer. In jedem Monomer sind ein Molekül ADPNP sowie ein Mg^{2+} -Ion gebunden. Die beiden Monomere sind nahezu identisch und bei einer Überlagerung weisen korrespondierende C_{α} -Atome eine *r.m.s.*-Abweichung von 0,47 Å auf. Aufgrund der gleichen experimentellen Vorgehensweise wie bei dem Aktivator^{red,ADP}, kann angenommen werden, dass auch diese Aktivatorstruktur den reduzierten Zustand darstellt (Aktivator^{red,ADPNP}).

ADPNP-Bindungsstelle. ADPNP ist wie ADP in der Struktur des Aktivators^{red,ADP} nicht-kovalent im Spalt zwischen den beiden β -Faltblättern gebunden. Die Aminosäuren, die mit dem Nukleotid interagieren (Abbildung 4-13) sind im Wesentlichen die gleichen, die auch an der Bindung von ADP beteiligt sind (vgl. Abbildung 4-8).

Zusätzlich werden jedoch die beiden vicinalen Hydroxygruppen der Ribose neben Asp134 nun auch noch vom Carbonylsauerstoffatom von Gly130 koordiniert. Das γ -Phosphat von ADPNP interagiert mit der Hydroxygruppe von Ser10 sowie den Hauptkettenatomen der Aminosäuren Gly102, Gln103 und Asp104. Das Mg^{2+} -Ion ist oktaedrisch von je einem Sauerstoffatom des β - und γ -Phosphates sowie von vier Wassermolekülen mit einer durchschnittlichen Bindungslänge von 2,1 Å koordiniert. Die Wassermoleküle befinden sich wiederum in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu Asp7, Glu79, His83 und Asp99. Alle

drei Phosphatgruppen befinden sich in dem Kanal, der durch das Protein führt. Die Qualität der Elektronendichtekarten lässt zusammen mit dem Ergebnis der Verfeinerung darauf schließen, dass die Besetzung von MgADPNP in beiden Monomeren 100 % beträgt.

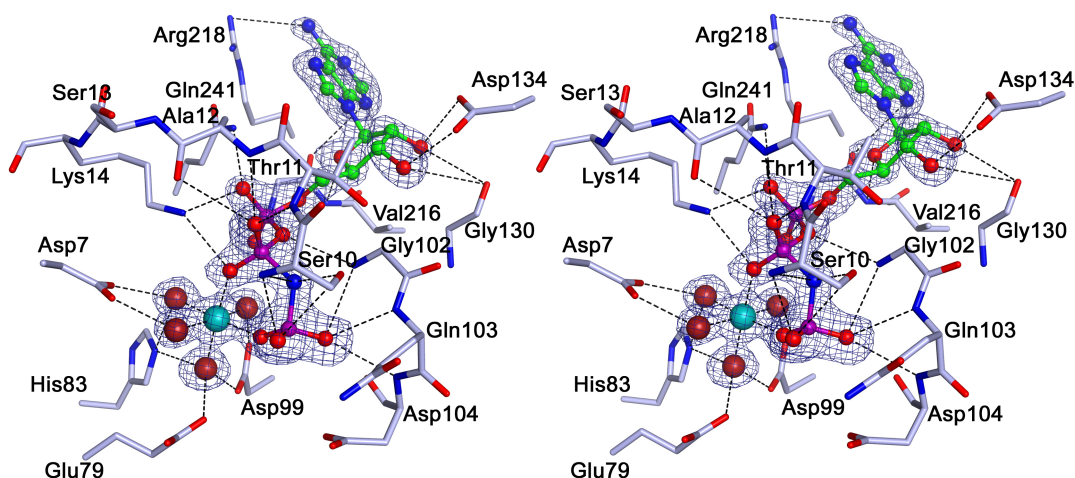


Abbildung 4-13: Stereoabbildung der Nukleotidbindungsstelle mit ADPNP. Das Nukleotid ist als Kugel- und Stäbchenmodell dargestellt und koordinierende Reste als Stäbchenmodell, wobei Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau und Phosphoratome violett gezeigt sind. Die Kohlenstoffatome der Aminosäuren sind grau, die des Nukleotids grün. Wassermoleküle sowie das Mg^{2+} -Ion sind als dunkelrote bzw. cyanfarbene Kugeln dargestellt. Die *simulated-annealing omit map* ist in dunkelblau gezeigt (Konturlevel 3 σ). Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Die Umgebung des [4Fe-4S]-Zentrums. Der zentrale Teil des Dimers besitzt nahezu den gleichen Aufbau wie im Aktivator^{red,ADP}. Das Fe/S-Zentrum ist am N-terminalen Ende der Cluster-Helix lokalisiert und wird von den Cysteinresten 125 und 164 beider Monomere koordiniert. Die Cluster-Helices in einem Dimer schließen einen Winkel von 98,7° ein. Wie bei dem Aktivator^{red,ADP} ist das Fe/S-Zentrum an der Proteinunterseite von Thr165 und Val166 beider Monomere vor dem Lösungsmittel geschützt, während er auf der Oberseite frei zugänglich ist. Auch hier ist auf der Lösungsmittel-exponierten Seite ein Wassermolekül in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu einem Schwefelatom des Fe/S-Zentrums zu finden.

4.2.6 Die Struktur des Aktivators ohne Nukleotid

Gesamtstruktur und Topologie. Der Aktivator wurde in Gegenwart von ADP und AlF_4^- kristallisiert und die Struktur konnte mittels Patterson-Suchmethoden mit homologem Suchmodell gelöst werden (3,0 Å Auflösung). Anders als die Kristalle des Aktivators^{red,ADP} und des Aktivators^{red,ADPNP} gehören diese Kristalle zur Raumgruppe $I4_1$ und es ist nur ein Monomer in der asymmetrischen Einheit enthalten. Durch die kristallographische Symmetrie wird jedoch wieder ein Dimer erzeugt, wobei die Monomere durch das [4Fe-4S]-Zentrum

verbrückt werden (Abbildung 4-14). Ein Monomer besteht wie bei dem Aktivator^{red,ADP} und dem Aktivator^{red,ADPNP} aus den zwei Domänen I und II und umfasst acht α -Helices sowie zehn β -Stränge. Zwar entspricht die Topologie der einzelnen Domänen im Wesentlichen derjenigen des Aktivators^{red,ADP} bzw. des Aktivators^{red,ADPNP}, doch ist der Winkel zwischen den Domänen I und II ist deutlich größer.

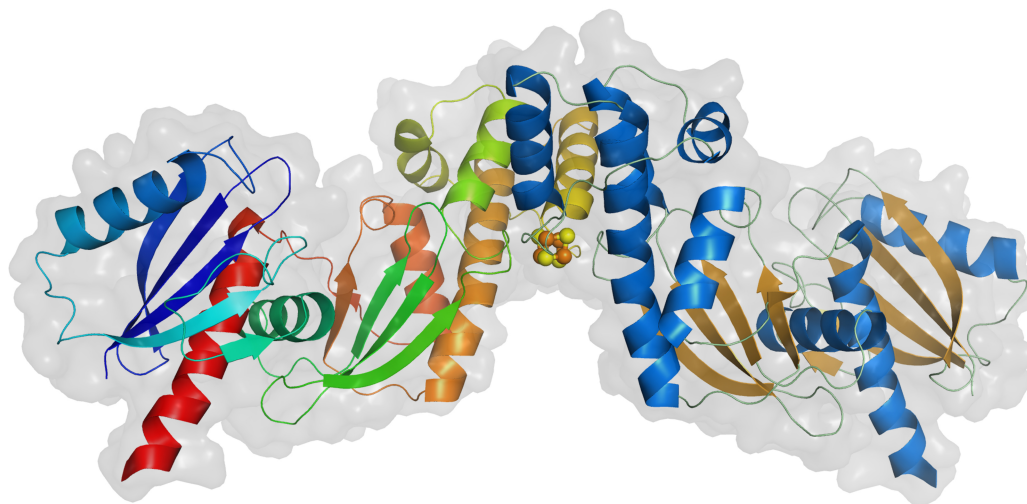


Abbildung 4-14: Bänderdarstellung des Aktivators ohne Nukleotid. Das rechte Monomer ist entsprechend seiner Sekundärstruktur gefärbt (α -Helices in blau, β -Stränge in gelb und loops in grün). Das linke Monomer ist in Regenbogenfarben gezeigt, wobei der N-Terminus blau ist und der C-Terminus rot. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugel- und Stäbchenmodell dargestellt, wobei Eisenatome orange und Schwefelatome gelb gefärbt sind. Die Oberfläche ist in grau dargestellt.

Das Dimer hat die Dimensionen $40 \times 65 \times 110 \text{ \AA}^3$ und eine Solvens-zugängliche Oberfläche von 24.395 \AA^2 . Die Dimerkontaktfläche ohne [4Fe-4S]-Zentrum beträgt 360 \AA^2 . Die einzigen Interaktionen zwischen den Monomeren sind wie bei dem Aktivator^{red,ADP} bzw. dem Aktivator^{red,ADPNP}. Wie in Abschnitt 4.2.4 erläutert kann davon ausgegangen werden, dass sich der Aktivator im reduzierten Zustand befindet.

Die Umgebung des [4Fe-4S]-Zentrums. Die Position und die Koordinierung des Fe/S-Zentrums sowie seine Umgebung sind nahezu wie bei den Strukturen des Aktivators^{red,ADP} und Aktivators^{red,ADPNP}. Der Helix-Cluster-Helix-Winkel beträgt $104,6^\circ$.

Nukleotidbindungsstelle. Die Strukturen des Aktivators^{red,ADP} und Aktivators^{red,ADPNP} haben gezeigt, dass die Nukleotidbindungsstelle im Spalt zwischen den β -Faltblättern lokalisiert ist, d.h. dort, wo die Domänen I und II aneinander stoßen. Obwohl der Aktivator in Gegenwart von ADP und AlF_4^- kristallisiert worden war, war weder das Nukleotid noch AlF_4^- in der Struktur gebunden. Stattdessen ist die Nukleotidbindungsstelle leer, so dass die beschriebene Struktur die Nukleotid-freie Form des Aktivators darstellt (Aktivator^{red,Nf}).

4.3 Die Dehydratase der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

4.3.1 Genexpression und Proteinreinigung

Die Genexpression erfolgte heterolog in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL unter anoxischen Bedingungen mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 0,9 g Nasszellgewicht pro Liter Zellkultur. Wurden Kulturen mit einem Volumen > 2 l angesetzt, so fiel die Ausbeute geringer aus.

Bei der Reinigung wurden Anionenaustauscher- und hydrophobe Interaktionschromatographieläufe durchgeführt. Die Reinheit überstieg 95 % und die durchschnittliche Ausbeute betrug 2,5 mg pro Gramm Nasszellgewicht.

4.3.2 Biochemische Charakterisierung

Bei der Analyse des gereinigten Proteins mittels denaturierender SDS-PAGE waren auf dem Polyacrylamidgel zwei Banden zu erkennen, die Molekulargewichten von 43 und 44 kDa entsprachen. Dies stimmt in etwa mit den theoretischen Werten (Gasteiger *et al.*, 2003) von 46,3 kDa für die α -Untereinheit (HadB, 408 Aminosäuren) und 43,6 kDa für die β -Untereinheit (HadC, 375 Aminosäuren zuzüglich 10 Aminosäuren für die Verbindungssequenz und das *Strep-tag* II-Peptid) überein. Die analytische Gelfiltration ergab, dass die Dehydratase als Heterodimer mit einem Molekulargewicht von 82 kDa vorliegt (vgl. Abschnitt 3.12.2, theoretischer Wert (Gasteiger *et al.*, 2003): 89,9 kDa).

Das UV/Vis-Absorptionspektrum der Dehydratase, das unmittelbar nach der Reinigung aufgenommen wurde, weist eine leichte Schulter im Bereich von 320 nm sowie ein Maximum im Bereich von 410 nm auf (Abbildung 4-15) und entspricht dem eines typischen Proteins, das mindestens ein [4Fe-4S]-Zentrum enthält (Lippard & Berg, 1995). Da die Reinigung unter leicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt worden war (2 mM DTT) und die Dehydratase ein Redoxpotenzial von ca. -600 mV besitzt (Kim *et al.*, 2005), befand sich das Protein in der oxidierten Form. Das Verhältnis von A_{410} zu A_{280} lag im Bereich von 0,16-0,20. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug durchschnittlich 8 U/mg, variierte aber je nach Reinigung im Bereich von 3-25 U/mg. War das Verhältnis von A_{410} zu A_{280} < 0,18, so wurde eine Rekonstitution durchgeführt. Diese führte zwar dazu, dass das Verhältnis auf 0,19 verbessert werden konnte, doch eine Erhöhung der Aktivität wurde nicht festgestellt.

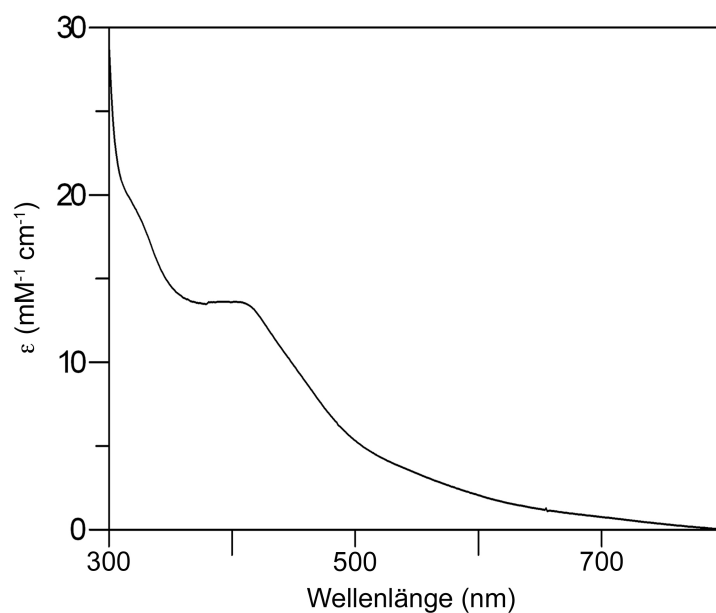


Abbildung 4-15: UV/Vis-Absorptionsspektrum der Dehydratase. Das Spektrum wurde unmittelbar nach der Reinigung aufgenommen. Die Dehydratase (34 μM) befand sich in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) mit 2 mM DTT.

4.3.3 Reduktion der Dehydratase

Die Dehydratase konnte mit Hilfe des Aktivators innerhalb von 12 min vollständig reduziert werden (Abbildung 4-16A). Hierbei ist eine Abnahme der Absorption im Bereich von 410 nm zu beobachten, was mit der Reduktion eines $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums übereinstimmt.

Auch das Verfahren der Photoreduktion konnte angewendet werden, um die Dehydratase zu reduzieren (Abbildung 4-16B). Hierbei wird ein durch Licht vom Elektronendonator abgespaltenes Elektron mit Hilfe eines Mediators auf die Dehydratase übertragen. Die Reduktion war bei Verwendung von Natriumoxalat als Elektronendonator innerhalb von 14 min abgeschlossen. Wurde Glycin als Elektronendonator eingesetzt, verlief die Reduktion etwas langsamer. Um die Reversibilität der Photoreduktion zu überprüfen, sollte die Dehydratase mittels $\text{K}_3\text{Fe(III)(CN)}_6$ bzw. Thioninacetat reoxidiert werden, was jedoch nicht erfolgreich war. Wurde (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA zu der photoreduzierten Dehydratase gegeben, konnte ein Anstieg der Absorption bei 290 nm beobachtet werden, was durch die Dehydratisierung des Substrates zu 2-Hydroxyisocaprenoyl zu erklären ist (vgl. Abschnitt 3.11.6).

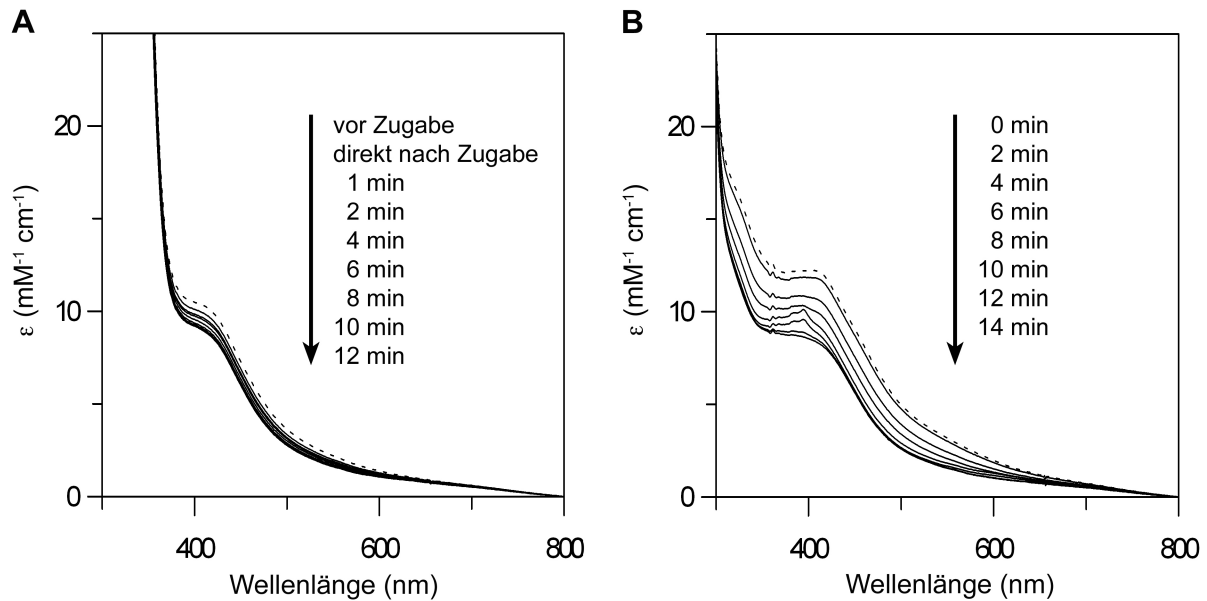


Abbildung 4-16: Reduktion der Dehydratase. Die Reduktion wurde durch die Aufnahme von UV/Vis-Absorptionsspektren verfolgt. (A) Die Reduktion erfolgte durch den Aktivator. Der Ansatz enthielt 34 μM Dehydratase, 5 mM DTT, 1 mM Natriumdithionit, 5 mM MgCl_2 und 1 mM ATP in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0). Durch Zugabe von 0,4 μM Aktivator wurde die Reduktion gestartet. (B) Photoreduktion der Dehydratase. Der Ansatz enthielt 34 μM Dehydratase, 10 mM Natriumoxalat, 1 μM Methylviologen und 2,6 μM Deazaflavinderivat in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0).

4.3.4 Der Komplex aus Dehydratase und Aktivator

Die Komplexbildung wurde mittels analytischer Gelfiltration untersucht. Abbildung 4-17 zeigt zunächst die Chromatogramme des Aktivators und der Dehydratase. Aus den Elutionsvolumina ergeben sich Molekulargewichte von 72 kDa für den Aktivator und 82 kDa für die Dehydratase. Das Elutionsverhalten des Aktivators war unabhängig davon, ob er in Gegenwart von ADP oder ADPNP gereinigt oder vor dem Gelfiltrationslauf mit ADP und AlF_4^- inkubiert worden war (Daten nicht gezeigt). Die Mischung der Dehydratase mit dem Aktivator in Gegenwart von ADP führte zu einem einzigen Absorptionssgipfel, der aus der Überlagerung der einzelnen Absorptionssgipfel der Dehydratase und des Aktivators resultierte. Wurden hingegen der Aktivator und die Dehydratase in Gegenwart von ADPNP oder $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ inkubiert, so ist im Chromatogramm neben dem Absorptionssgipfel, der von dem Aktivator und der Dehydratase rührt, ein zusätzlicher Absorptionssgipfel zu finden, der einem Molekulargewicht von 131 kDa entspricht. Die Analyse der Fraktionen dieses Absorptionssgipfels mittels SDS-PAGE ergab, dass sowohl Aktivator als auch Dehydratase in den Fraktionen enthalten waren. Somit kann sich bei Anwesenheit von ADPNP bzw. ADP und AlF_4^- ein Komplex aus Aktivator und Dehydratase bilden (theoretisches

Molekulargewicht (Gasteiger *et al.*, 2003): 149 kDa).

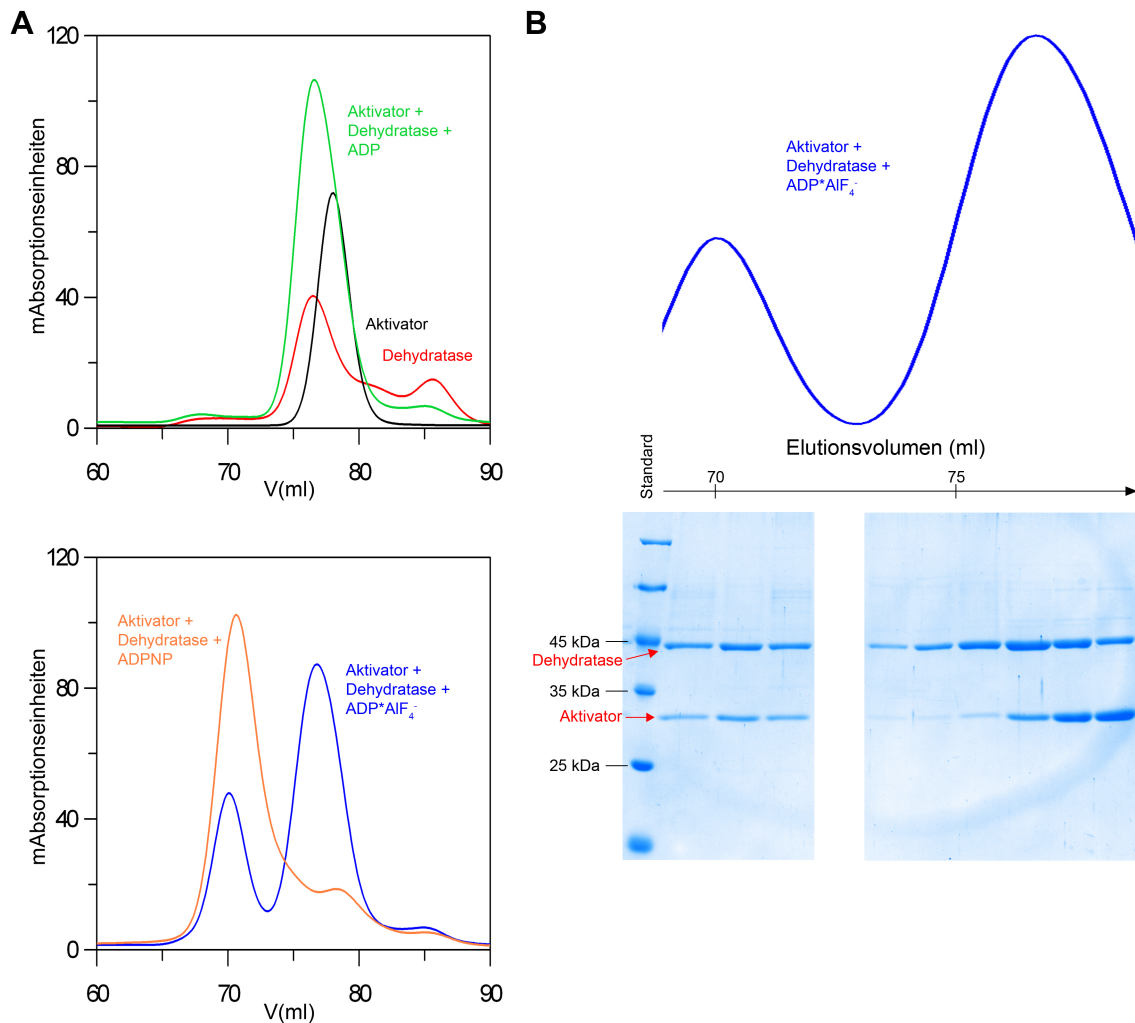


Abbildung 4-17: Komplexbildung zwischen Aktivator und Dehydratase. (A) Gelfiltration zur Untersuchung der Komplexbildung. Gezeigt sind die Chromatogramme des Aktivators (schwarz) und der teilgereinigten Dehydratase (rot) sowie die von drei verschiedenen Komplexbildungsansätzen: (1): Aktivator + Dehydratase + ADP (grün), (2) Aktivator + Dehydratase + ADPNP (orange) und (3) Aktivator + Dehydratase + $ADP \cdot AlF_4^-$ (blau). Die exakte Zusammensetzung der Komplexbildungsansätze sind den Abschnitten 3.12.1 und 3.12.2 zu entnehmen. Von jeder Probe wurde 1 mg Protein aufgetragen. (B) Bild eines Polyacrylamidgels (12 %). 10 μ l jeder 1 ml-Fraktion der Gelfiltration des Komplexansatzes (3) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Als Standard diente der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas (SM0431, 10 μ l). Über dem Gelbild ist das Elutionsdiagramm des Komplexes (3) für den zu den Fraktionen korrespondierenden Bereich gezeigt.

4.3.5 Die Kristallisation der Dehydratase

Dehydratasekristalle wuchsen innerhalb von 1-3 Wochen nach Ansetzen der Tropfen, unabhängig davon, ob sie mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproat kokristallisiert wurden oder nicht. Die Kristalle wiesen eine braune Farbe auf und hatten eine Größe von 0,1-0,5 mm (Abbildung 4-18). Optisch zeigten die Kristalle in der Cryolösung sowie während der Inkubation in

soaking-Lösung keine Veränderungen.

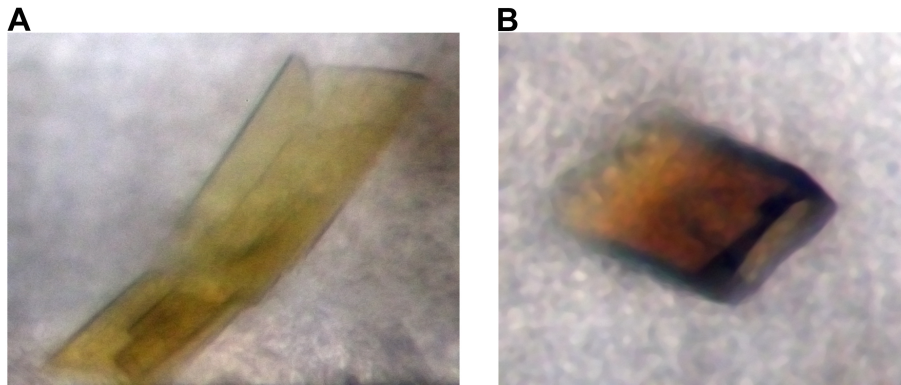


Abbildung 4-18: Kristalle der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase. (A) Kristall der Dehydratase (B) Kristall der mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproat kokristallisierten Dehydratase. Die Kristallisation erfolgte unter anoxischen und leicht reduzierenden Bedingungen. Die Zusammensetzung der jeweiligen Protein- und Reservoirolösung ist Abschnitt 3.11.8 zu entnehmen.

4.3.6 Kristallisation des Komplexes und Charakterisierung der Kristalle

Für die Kristallisation des Aktivierungskomplexes wurden drei Komplexbildungsansätze verwendet, die sich in dem anwesenden Nukleotid unterschieden. Entweder wurde ADPNP eingesetzt oder es wurden ADP und AlF_4^- bzw. ADP und VO_4^{3-} benutzt (vgl. Abschnitt 3.12.3). VO_4^{3-} -Spezies neigen zur Polymerisation, so dass auf die Analyse des Komplexansatzes mit $\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$ mittels analytischer Gelfiltration verzichtet wurde, um das Säulenmaterial nicht zu schädigen. Bei $\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$ handelt sich wie bei $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ um ein Übergangszustandsanalogon, weshalb angenommen wurde, dass seine Anwesenheit ebenfalls zur Komplexbildung führt. Die Ansätze wurden nach der Inkubation mittels Ultrafiltration entweder nur konzentriert oder aber gereinigt. Braune Kristalle sind bei insgesamt 77 verschiedenen Bedingungen im Zeitraum von wenigen Tagen bis zu drei Wochen gewachsen. Die Kristalle wurden Röntgenbeugungsexperimenten unterzogen und es erfolgte – sofern möglich – eine Indizierung. Oftmals war dies aufgrund schlechter Beugung jedoch nicht möglich. Die Kristalle, bei denen eine Indizierung erfolgreich war, gehörten alle zu der Raumgruppe *I4* (bzw. *I4*₁) oder *P4* (bzw. *P4*₁) und besaßen Zellkonstanten ähnlich zu denen der Kristalle des Aktivator^{red,Nf}.

Von einem Kristall wurde ein vollständiger Datensatz aufgenommen (Kristall 48). Dieser entstammte einem Kristallisationsansatz, bei dem ADPNP für die Komplexbildung verwendet worden waren. Der Matthews-Koeffizient deutete bereits darauf hin, dass die asymmetrische Einheit zu klein war, um den Aktivierungskomplex zu beinhalten. Initiale Phasen wurden mit

Hilfe der Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell erhalten, wobei die zwei Domänen eines Aktivatormonomers der Struktur des Aktivators^{red,ADP} (vgl. Abschnitt 3.10.5) als Suchmodelle dienten. Es stellte sich heraus, dass die asymmetrische Einheit zwei Aktivatormonomere enthielt, die über eine zweizählige Rotationsachse verbunden waren, auf der das verbrückende [4Fe-4S]-Zentrum lokalisiert war. Die Struktur wurde bis zu einer Auflösung von 2,45 Å verfeinert (vgl. Tabelle 3-7). Weder ADP noch AlF_4^- waren im Aktivator gebunden. Ein Vergleich mit der Struktur des Aktivator^{red,Nf} ergab, dass die beiden Strukturen nahezu identisch sind, auch wenn sie sich leicht in der Orientierung der Domäne I zu der Domäne II unterscheiden. Die *r.m.s.*-Abweichungen korrespondierender C_α -Atome bei einer Überlagerung betragen 0,29 Å für Domäne I und 0,58 Å für Domäne II. Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturen wird auf eine weitere Beschreibung verzichtet.

Um zu überprüfen, ob die Kristalle den Komplex oder nur einzelne Komponenten enthielten, wurden alle mittels SDS-PAGE analysiert. Als Referenz wurde der Kristall verwendet, von dem der komplette Datensatz aufgenommen worden war und der nur den Aktivator enthielt. Bei einigen Kristalle musste auf das Waschen verzichtet werden, da sie sich sofort auflösten. Abbildung 4-19 zeigt exemplarisch das Bild eines resultierenden Polyacrylamidgels. Bei allen Bahnen ist eine Bande zu erkennen, die einer Größe von circa 30 kDa entspricht und die basierend auf der Referenz dem Aktivator zuzuordnen ist. Darüber hinaus finden sich bei einigen Bahnen schwache Banden, die einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa entsprechen und auf das Vorhandensein der Dehydratase hindeuten. Die Dehydratase liegt in diesen Proben im Vergleich zu dem Aktivator in substöchiometrischen Mengen vor und ist wahrscheinlich auf ungenügendes Waschen zurückzuführen bzw. darauf, dass das Waschen aufgrund der Instabilität der Kristalle gar nicht durchgeführt werden konnte. Somit wurde wahrscheinlich in allen Fällen der Aktivator alleine kristallisiert.

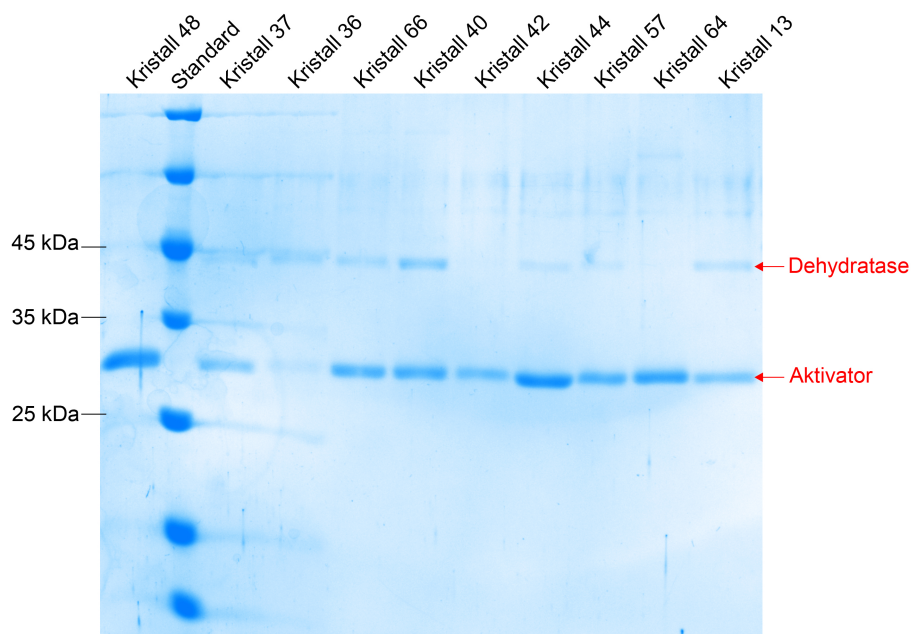


Abbildung 4-19: Analyse der aufgelösten Komplexkristalle mittels SDS-PAGE. Gezeigt ist das Bild des 12%igen Polyacrylamidgels. Die eingefrorenen Kristalle wurden in einem anaeroben Handschuhkasten aufgetaut, in bidestilliertem Wasser gewaschen und in 5 μ l bidestilliertem Wasser aufgelöst, wobei in manchen Fällen das Waschen nicht möglich war. Die gesamte Probe wurde eingesetzt. Als Standard diente der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas (SM0431, 10 μ l). Die entsprechenden Kristallisationsbedingungen sind in **Tabelle 9-1** aufgelistet. Die Röntgenstrukturanalyse von Kristall 48 zeigte, dass dieser nur den Aktivator beinhaltetete.

4.3.7 Die Struktur der Dehydratase

Da dies die erste Struktur einer Dehydratasekomponente aus der Familie der (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen ist, erfolgte die Phasierung mittels MAD-Technik, wobei die anomale Streuung der Eisenatome der Fe/S-Cluster ausgenutzt wurde (Auflösung: 1,82 Å) (Knauer *et al.*, 2011).

Gesamtstruktur. In der asymmetrischen Einheit befanden sich zwei Kopien des Dehydratase-Heterodimers (Kim *et al.*, 2005). Das Heterodimer misst circa 95 x 60 x 60 Å³ und besitzt eine Solvens-zugängliche Oberfläche von durchschnittlich 29.495 Å² (Abbildung 4-20 A). Die Dimerkontaktfläche (Differenz der Solvens-zugänglichen Oberfläche der isolierten und der im Dimer befindlichen Monomere, dividiert durch zwei) beträgt im Mittel 2.120 Å².

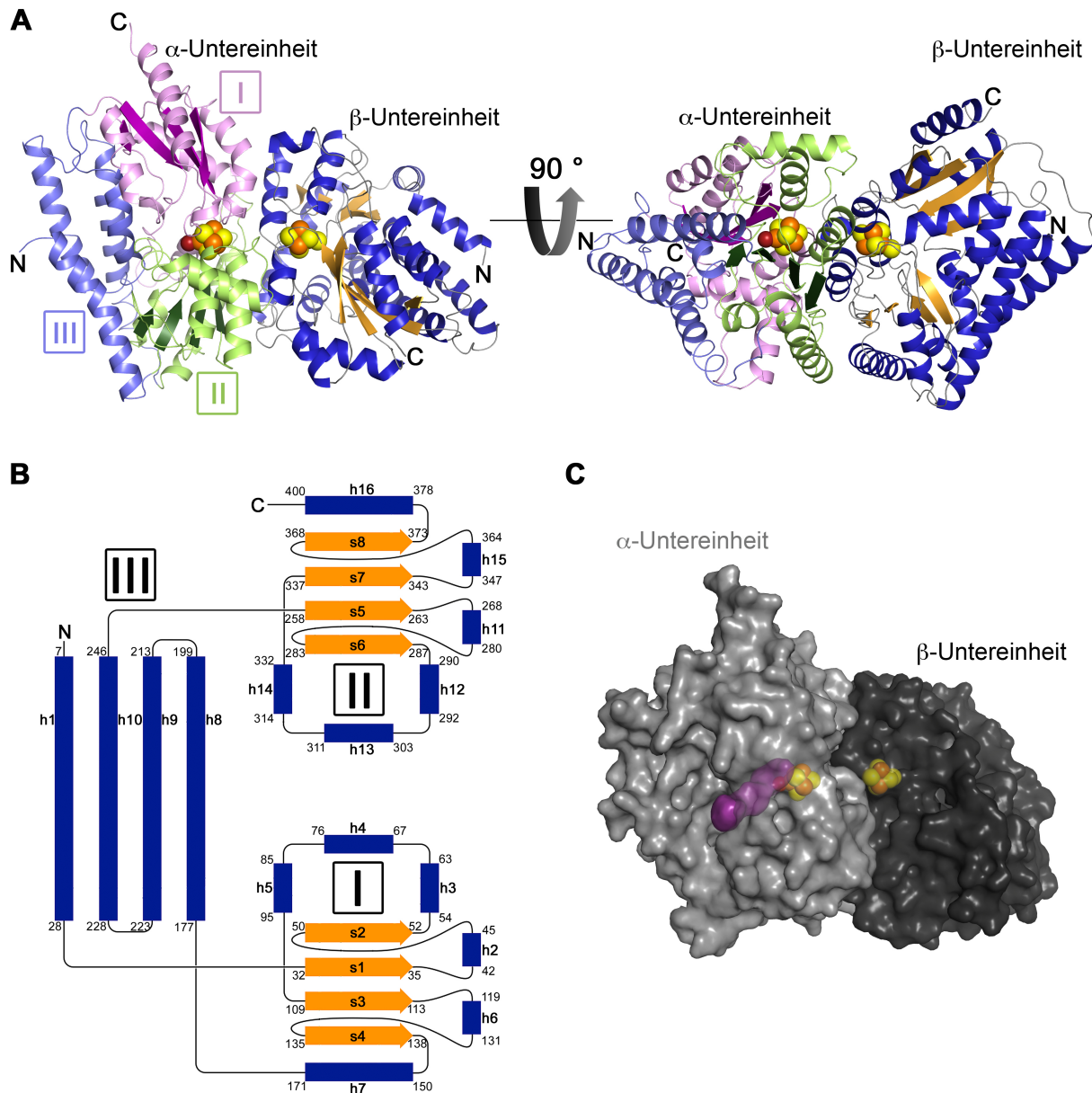


Abbildung 4-20: Struktur der Dehydratase. (A) Bänderdarstellung des Heterodimers, wobei die α-Untereinheit nach Domänen (I-III) und die β-Untereinheit entsprechend der Sekundärstrukturelemente (α-Helices in blau, β-Faltblätter in gelb und *loops* in grau) eingefärbt ist. Die [4Fe-4S]-Zentren mit ihrem jeweiligen terminalen Liganden sind als Kugeln gezeigt (Schwefelatome in gelb, Eisenatome in orange und Sauerstoffatome in rot). (B) Schematische Darstellung der Topologie der α-Untereinheit. α-Helices (h1-h16) sind in blau, β-Faltblätter (s1-s8) in gelb gezeigt. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäure am Anfang bzw. Ende eines Sekundärstrukturelements. (C) Oberflächendarstellung der Dehydratase. Die [4Fe-4S]-Zentren sind wie in (A) dargestellt. Der Kanal, der in der α-Untereinheit von der Oberfläche zum [4Fe-4S]-Zentrum führt, ist in violett gezeigt.

Die α-Untereinheit (HadB) umfasst 16 α-Helices und acht β-Stränge und kann in drei Domänen aufgeteilt werden (Abbildung 4-20 A und B). Weiterhin enthält sie ein [4Fe-4S]-Zentrum (α-[4Fe-4S]-Zentrum). Die Domänen I und II weisen eine gemischte α/β-Faltung auf und ähneln sich stark in ihrer Topologie. In jeder Domäne ist hierbei das zentrale

Element – ein paralleles β -Faltblatt bestehend aus 4 β -Strängen in der Reihenfolge 2-1-3-4 – von α -Helices umgeben. Das α -[4Fe-4S]-Zentrum befindet sich an der Kontaktfläche der Domänen I und II, wobei die Domänen so angeordnet sind, dass die β -Faltblätter in Richtung des Fe/S-Zentrums zeigen. Bei Domäne III handelt es sich um ein α -helikales Bündel, das die Domänen I und II verbindet. Ein Kanal von circa 17 Å Länge führt von der Oberfläche in das Innere der Untereinheit und endet in einer Höhle am α -Zentrum (Abbildung 4-20 C).

Die β -Untereinheit (HadC) besteht wie die α -Untereinheit aus 16 α -Helices und acht β -Strängen und enthält ebenfalls ein [4Fe-4S]-Zentrum (β -[4Fe-4S]-Zentrum). Die Überlagerung der beiden Untereinheiten zeigt, dass sich die Untereinheiten bezüglich ihrer Topologie sowie der Position des Fe/S-Zentrums sehr ähnlich sind (Abbildung 4-21). Die *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C_α -Atome liegt bei 1,99 Å, die Distanz zwischen äquivalenten Eisenatomen der zwei Fe/S-Zentren beträgt 2,9 Å.

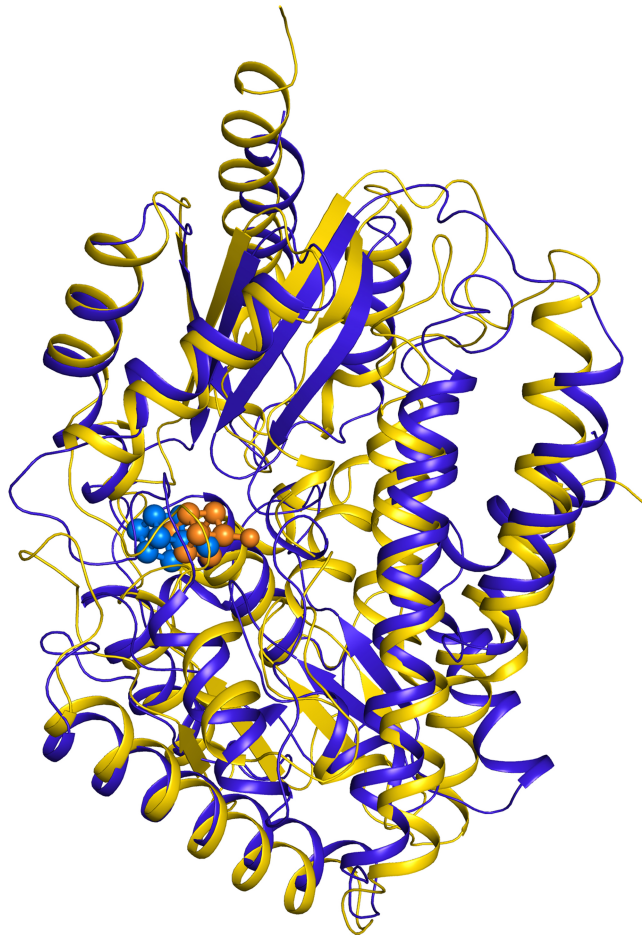


Abbildung 4-21: Überlagerung der α - und β -Untereinheit der Dehydratase. Die Untereinheiten sind in der Bänderdarstellung, die [4Fe-4S]-Zentren mit ihrem jeweiligen terminalen Liganden als Kugel- und Stäbchenmodell gezeigt. Die α -Untereinheit ist gelb, die β -Untereinheit blau. Die Überlagerung basiert auf den C_α -Atomen. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Die Fe/S-Zentren. Das β -[4Fe-4S]-Zentrum ist im Inneren der β -Untereinheit lokalisiert. Es ist vollständig vom Protein umgeben, so dass es unzugänglich für das Lösungsmittel ist (Abbildung 4-22). Drei der vier Eisenatome werden von Cysteinresten koordiniert (Cys72, Cys99 und Cys325), das vierte Eisenatom hingegen hat keinen Aminosäureliganden und wird deshalb als „besonderes Eisenatom“ bezeichnet. Es besitzt einen elektronenreichen, terminalen Liganden, so dass sich eine tetraedrische Koordination ergibt. Der anomale Streubeitrag des Liganden bei einer Wellenlänge von 1,76 Å ist ähnlich zu dem der Schwefelatome von Cysteinen, Methioninen und [4Fe-4S]-Zentren in der Dehydratase (siehe Abbildung 4-22 und Tabelle 3-5). Weiterhin befindet er sich in einer hydrophoben Tasche und es gibt keine Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäuren des umgebenden Proteins. Schließlich beträgt die durchschnittliche Ligand-Eisen-Bindungslänge 2,3 Å. All diese Fakten deuten darauf hin, dass es sich bei dem terminalen Liganden des besonderen Eisenatoms um eine SH-Gruppe handelt.

Wie das β -[4Fe-4S]-Zentrum, so ist auch das α -[4Fe-4S]-Zentrum nur von drei Cysteinresten (Cys84, Cys117 und Cys346) koordiniert. Das besondere Eisenatom besitzt wiederum einen terminalen Liganden und ist somit tetraedrisch koordiniert. Der Ligand wurde als Wassermolekül bzw. als Hydroxidion (OH_x) modelliert, da dies zum einen in Übereinstimmung mit der Elektronendichte ist und zum anderen die durchschnittliche, verfeinerte Ligand-Eisen-Bindungslänge bei 2,03 Å liegt. Außerdem konnte bei den verwendeten Wellenlängen keine anomale Streuung des Liganden beobachtet werden. Glu55 befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu dem Wassermolekül / Hydroxidion. Die Seitenkette von Glu55 wird von Ser37 so positioniert, dass das anti-orientierte, nicht-bindende freie Elektronenpaar des Carbonylsauerstoffatoms in Richtung des terminalen Liganden orientiert ist (Gandour, 1981; Rebek, 1990).

Die kürzeste Distanz zwischen den Ecken des α - und β -[4Fe-4S]-Zentrums beträgt circa 12 Å, die kürzeste Distanz des jeweiligen Zentrums zur Proteinoberfläche circa 11 Å. Bei beiden Fe/S-Zentren ist nur ein potenzieller Wasserstoffbrückenbindungsdonor zu finden. Hierbei handelt es sich um ein Wassermolekül in der Nähe des α - bzw. β -[4Fe-4S]-Zentrums, das sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu dem Schwefelatom auf der dem besonderen Eisenatom gegenüberliegenden Seite des jeweiligen Zentrums befindet.

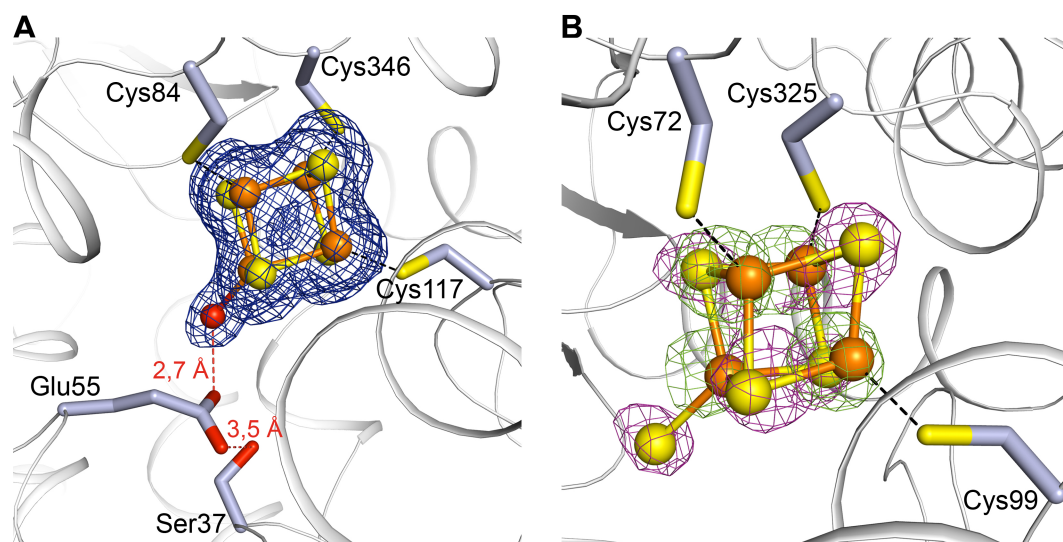


Abbildung 4-22: Koordination der Fe/S-Zentren der Dehydratase. Die [4Fe-4S]-Zentren und die terminalen Liganden sind als Kugel- und Stäbchenmodell dargestellt, das Proteinrückgrat als Bändermodell und einige Aminosäuren als Stäbchenmodell (Schwefelatome sind gelb, Eisenatome orange und Sauerstoffatome rot). Koordinierende Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen sind als durchbrochene Linien in schwarz und rot gezeigt. **(A)** [4Fe-4S]-Zentrum der α -Untereinheit (α -[4Fe-4S]-Zentrum). Die *simulated annealing omit map* für das Fe/S-Zentrum und den terminalen Liganden ist in blau dargestellt (Konturlevel: 2,5 σ). Der Besetzungsgrad des besonderen Eisenatoms und des koordinierenden Wassermoleküls/Hydroxidions wurde auf 70 % geschätzt. **(B)** [4Fe-4S]-Zentrum der β -Untereinheit (β -[4Fe-4S]-Zentrum). Die anomalen Differenz-Fourier-Karten für Schwefel (der Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 1,76 Å aufgenommen) und Eisen (der Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 1,73980 Å aufgenommen) sind in violett und grün gezeigt (Konturlevel: 4,5 σ und 15,5 σ). Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Substratbindung. Um die Bindung des Substrates zu untersuchen wurde ein Dehydratasekristall in einer *soaking*-Lösung inkubiert, die (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA enthält. Ein Datensatz wurde aufgenommen (2,3 Å Auflösung, siehe Tabelle 3-6) und die Phasierung erfolgte mittels der Patterson-Suchmethode, wobei die Struktur der Substrat-freien Dehydratase als homologes Suchmodell verwendet wurde. Die Elektronendichtekarten zeigen, dass sich (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA in dem Kanal befindet, der in der α -Untereinheit von der Proteinoberfläche ins Innere führt. Er wird deshalb als Substratkanal bezeichnet und die Erweiterung am α -[4Fe-4S]-Zentrum als Substratbindetasche. Der Besetzungsgrad des Substrates wurde anhand der Temperaturfaktoren von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA und der *B*-Faktoren der Atome des α -Zentrums auf 70 % geschätzt. Das Substrat ist so orientiert, dass sich der 2-Hydroxyisocaproyl-Teil in der Substratbindetasche befindet und das Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung das besondere Eisenatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums koordiniert. Hierdurch ergibt sich für das

Eisenatom eine verzerrt tetraedrische Koordination. Die Distanz zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und dem besonderen Eisenatom beträgt 2,2 Å. Da der Substratkanal nur eine Länge von circa 17 Å aufweist, befindet sich der 3'-phosphorilierte Adenosinteil von CoA außerhalb des Proteins, wo er nicht fest gebunden und auch nicht in der Elektronendichte definiert ist.

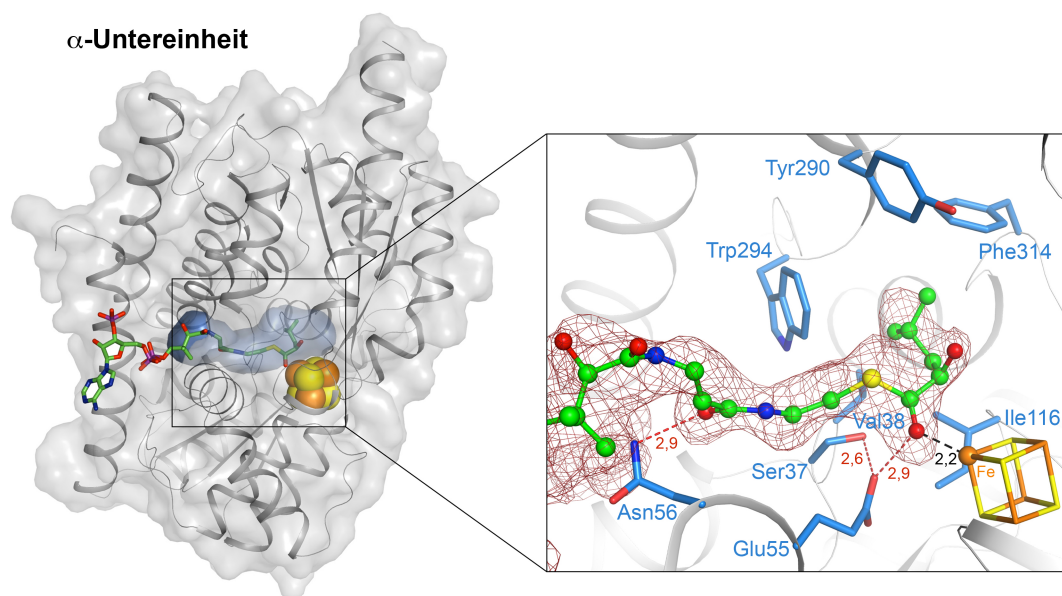


Abbildung 4-23: Substratbindung in der Dehydratase. Die α -Untereinheit ist in der Oberflächen- und Bänderdarstellung gezeigt, der Substratkanal ist in blau hervorgehoben. (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA ist als Stäbchenmodell gezeigt, das α -[Fe-4S]-Zentrum als Kugelmodell (Kohlenstoffatome sind grün, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, Phosphoratome violett, Eisenatome orange und Schwefelatome gelb gefärbt). Die Vergrößerung zeigt das aktive Zentrum mit der gleichen Farbcodierung wie in der Gesamtansicht. Zusätzlich sind ausgewählte Aminosäuren als Stäbchenmodell in blau dargestellt und das Substrat ist als Kugel- und Stäbchenmodell gezeigt. Durchbrochene Linien zeigen koordinative Bindungen (schwarz) und Wasserstoffbrückenbindungen (rot), wobei alle Abstände in Ångström angegeben sind. Die *simulated annealing omit map* für das Substrat ist in dunkelrot dargestellt (Konturlevel: 3 σ). Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Das Ende der Substratbindetasche besteht vorwiegend aus aromatischen und hydrophoben Aminosäuren. Der 2-Hydroxyisocaproyl-Teil des Substrates ist mit Ausnahme der 2-Hydroxygruppe apolar und es gibt nur eine einzige direkte Interaktion mit der Proteinumgebung. Die Carboxylatgruppe von Glu55 befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung (2,9 Å) und wird durch die Seitenkette von Ser37 in Richtung des Substrates positioniert. Innerhalb des Substratkanals weist der CoA-Teil des Substrates sowohl direkte Interaktionen mit dem Protein auf als auch indirekte Wechselwirkungen mittels Wassermoleküle.

Aufgrund der Koordinierung des Substrates am α -[4Fe-4S]-Zentrum befindet sich das Carbonylkohlenstoffatom der Thioesterbindung in einer Entfernung von 3,0 Å zu dem

besonderen Eisenatom. Der Abstand der 2-Hydroxygruppe zu dem besonderen Eisenatom beträgt 4,0 Å. Außerdem ist das antibindende π^* -Orbital der Thioestercarbonylgruppe in direkter Nachbarschaft des besonderen Eisenatoms positioniert.

Bindung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat. Die Dehydratase wurde außerdem in Gegenwart von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat kokristallisiert. Die Phasierung erfolgte mittels der Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell, wobei die Struktur der substratfreien Dehydratase als Modell eingesetzt wurde. Die Auflösung beträgt 2,0 Å und der Besetzungsgrad von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat wurde auf 70 % geschätzt. (*R*)-2-Hydroxyisocaproat ist wie auch (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA im Substratkanal bzw. in der Substratbindetasche der α -Untereinheit gebunden und koordiniert das besondere Eisenatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums mit einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe (Abbildung 4-24). Im Gegensatz zur substratgebundenen Struktur zeigt jedoch die 2-Hydroxygruppe in eine andere Richtung.

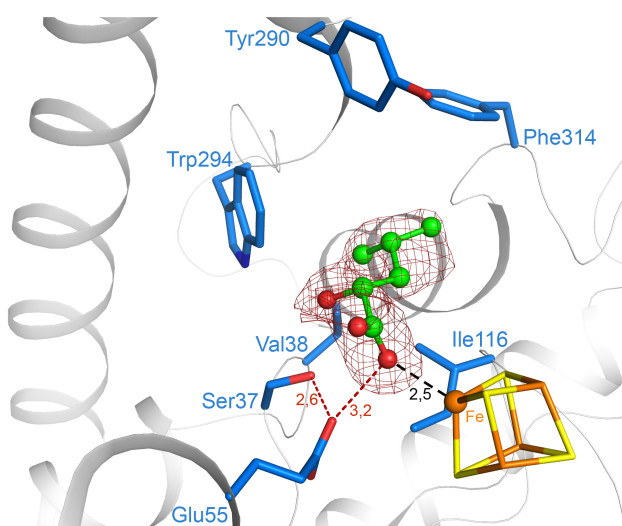


Abbildung 4-24: Bindung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat in der α -Untereinheit der Dehydratase.

Das Proteinrückgrat ist als Bändermodell in grau gezeigt, (*R*)-2-Hydroxyisocaproat als Kugel- und Stäbchenmodell und das α -[4Fe-4S]-Zentrum als Stäbchenmodell (Kohlenstoffatome sind grün, Sauerstoffatome rot, Eisenatome orange und Schwefelatome gelb gefärbt). Das besondere Eisenatom ist als Kugel hervorgehoben. Die *simulated annealing omit map* für (*R*)-2-Hydroxyisocaproat ist in dunkelrot dargestellt (Konturlevel: 3 σ). Einige Aminosäuren im aktiven Zentrum sind als Stäbchenmodell dargestellt (Kohlenstoffatome sind blau). Unterbrochene Linien repräsentieren koordinative Bindungen (schwarz) und Wasserstoffbrückenbindungen (rot). Distanzen sind in Ångström angegeben. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

5 Diskussion

5.1 Die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase

5.1.1 Reinigung und Kristallisation der CoA-Transferase

Die Genexpression der CoA-Transferase erfolgte nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2006). Erste Kristallisationsversuche mit dem Enzym, das nach Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2006) in nur einem Schritt mittels Affinitätschromatographie gereinigt worden war, führten nicht zu Kristallen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde eine aus drei Chromatographieschritten bestehende Reinigung etabliert, die zu einer deutlich gesteigerten Reinheit von > 95 % führte. Das auf diese Weise gereinigte Protein konnte kristallisiert werden.

5.1.2 Die Struktur der CoA-Transferase

Die Faltung der CoA-Transferase. Die zwei in der asymmetrischen Einheit gefundenen Monomere sind eng umeinander gewunden. Sie sind über einer zweizählige Rotationsachse miteinander verbunden und bilden ein Homodimer, das auch dem nativen Zustand entspricht (vgl. Abschnitt 4.1.1). Für die Interaktion zwischen den Monomeren ist hauptsächlich der Bereich verantwortlich, der die kleine mit der großen Domäne verbindet. Die ungewöhnliche Faltung der CoA-Transferase und die Anordnung der verketteten Monomere scheinen typisch für die Familie III der CoA-Transferasen zu sein, da sie auch bei anderen Vertretern dieser Familie zu finden ist. Beispiele hierfür sind Frc (Ricagno *et al.*, 2003), CaiB (Stenmark *et al.*, 2004) oder auch YfdW (Gruez *et al.*, 2003) (vgl. Abschnitt 1.5), von denen jeweils die Struktur mittels Röntgenkristallographie gelöst wurde. Es ist anzunehmen, dass die Faltung dieser CoA-Transferasen sehr komplex ist, da das Dimer nicht aus zwei vollständig gefalteten Monomeren gebildet werden kann. Ein möglicher Mechanismus beruht darauf, dass mehrere Ribosomen an der gleichen mRNA vorhanden sind. Somit können Peptidketten, die von unterschiedliche Ribosomen an der gleichen mRNA stammen, gleichzeitig gefaltet und miteinander verkettet werden. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Monomere (teilweise) ungefaltet in Lösung existieren können und die vollständige Faltung erst nach erfolgter Dimerisierung geschieht (Ricagno *et al.*, 2003).

Abbildung 5-1 zeigt die Überlagerung der (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase mit CaiB. Die *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C α -Atome beträgt 2,5-2,6 Å, bei einer Sequenzidentität von 23 %. Vergleicht man die entsprechende Domänen

einzelnen miteinander, so ergibt sich für korrespondierende C α -Atome der großen Domäne eine *r.m.s.*-Abweichung von 2,2-2,3 Å, während die *r.m.s.*-Abweichung der C α -Atome der kleinen Domäne im Bereich von 2,0-2,2 Å liegt. Die beiden Enzyme sind sich strukturell sehr ähnlich und zeigen weder in der großen noch in der kleinen Domäne signifikante Unterschiede. Frc hingegen besitzt in der kleinen Domänen einen zusätzlichen, aus 36 Aminosäuren bestehenden *loop*, der durch CoA-Bindung verschiedene Konformationen annimmt (Ricagno *et al.*, 2003). Ein Sequenzvergleich der Mitglieder der Familie III CoA-Transferasen ergibt moderate Sequenzidentitäten der großen Domäne (20-30 %) und geringe Sequenzidentitäten für die kleine Domäne (< 20 %). Im Fall von CaiB und der (*E*)-2-Isocaproenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase beträgt die Sequenzidentität der großen Domäne 24 %, die der kleinen Domäne 15 %. Die Variabilität in der kleinen Domäne ist eventuell der großen Vielfalt an Substraten zuzuschreiben, die die Enzyme der Familie III-CoA-Transferasen umsetzen {Heider, 2001 #213}.

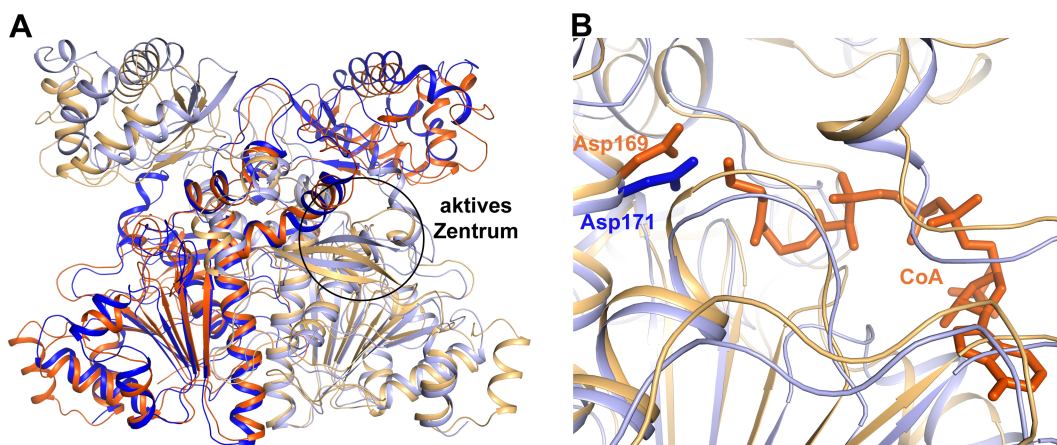


Abbildung 5-1: Überlagerung der (*E*)-2-Isocaproenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase (blau) und CaiB (orange). Die Enzyme sind in der Bänderdarstellung gezeigt. Die Überlagerung basiert auf C α -Atomen. (A) Gezeigt sind die Homodimere, wobei jeweils eines der Monomere farblich hervorgehoben ist. Von CaiB ist die substratfreie Struktur gezeigt (PDB-Nummer: 1XA3). Jedes Monomer besitzt zwei aktive Zentren, die im Spalt zwischen der kleinen und großen Domäne von verschiedenen Monomeren lokalisiert sind, wobei die Position von nur einem aktiven Zentrum eingezeichnet ist. (B) Gezeigt sind die aktiven Zentren, wobei nun die CoA-gebundene Struktur von CaiB gezeigt ist (PDB-Nummer: 1XA4). Bei CaiB ist das gebundene CoA als Stäbchenmodell dargestellt. Die für die Katalyse essentiellen Aspartatreste sind als Stäbchenmodell gezeigt.

Die Bindung von CoA. Für CaiB wurde gezeigt, dass jedes Monomer eine potenzielle CoA-Bindungsstelle besitzt (Stenmark *et al.*, 2004). Diese ist im Spalt zwischen der großen und kleinen Domäne von verschiedenen Monomeren lokalisiert. CoA bindet in diesem Spalt, interagiert aber nur mit der großen Domäne, was erklärt, warum die große Domäne stärker konserviert ist als die kleine. Durch die Bindung von CoA bewegt sich die kleine Domäne um

circa 3 Å auf die große Domäne zu, wodurch das aktive Zentrum leicht geschlossen wird. Die Bewegung ist wahrscheinlich deutlich größer, wenn das eigentliche Substrat gebunden wird. Die Schließung des aktiven Zentrums in Gegenwart von CoA und Substrat dient wahrscheinlich dem Schutz des aktivierten CoAS⁻-Anions und/oder des Enzym-Anhydrid-Intermediats während der Reaktion. Diese Domänenbewegung tritt wahrscheinlich in allen Familie III-CoA-Transferasen auf. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase zu CaiB ist anzunehmen, dass sich auch bei ihr die CoA-Bindungsstelle und das aktive Zentrum zwischen der großen und kleinen Untereinheit befindet und es zu einer Domänenbewegung nach CoA-Bindung kommt.

Das aktive Zentrum und der Katalysemechanismus. Basierend auf kinetischen und strukturellen Untersuchungen an Frc und CaiB wurde ein Reaktionsmechanismus für die Mitglieder der Familie III-CoA-Transferasen vorgeschlagen, der ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat beinhaltet (Jonsson *et al.*, 2004; Ricagno *et al.*, 2003; Stenmark *et al.*, 2004). Hierbei ist ein Aspartatrest im aktiven Zentrum essentiell für die Katalyse. Der hierzu korrespondierende Aspartatrest 171 wurde bei der (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase ebenfalls als essentiell identifiziert (Kim *et al.*, 2006). Somit kann in Analogie zu CaiB für die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase der folgende Reaktionsmechanismus postuliert werden (Abbildung 5-2).

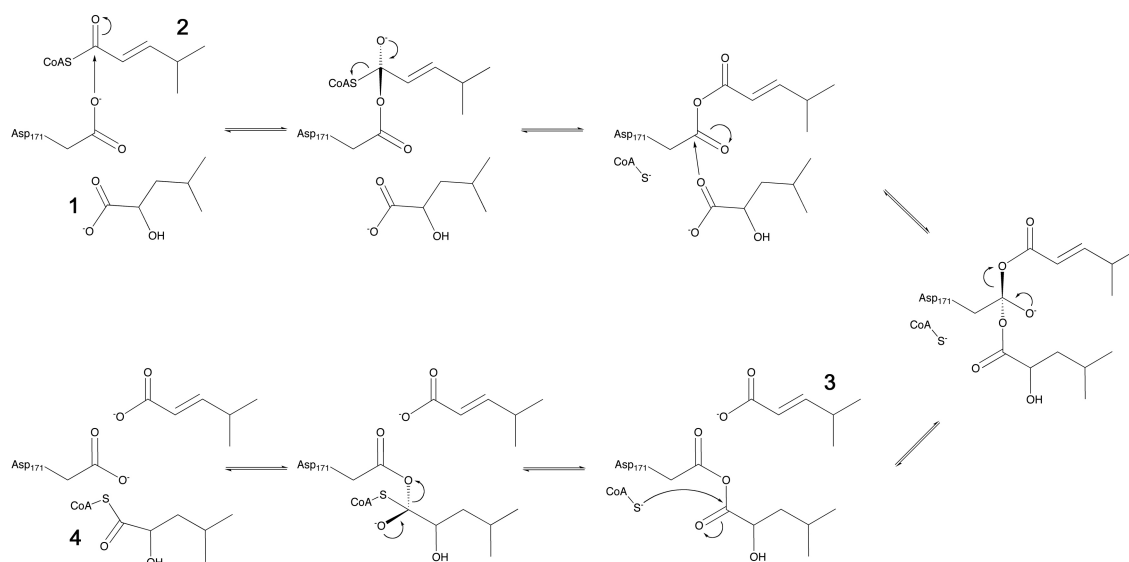


Abbildung 5-2: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für den CoA-Transfer von (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA auf (*R*)-2-Hydroxyisocaproat katalysiert durch die (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase. 1: (*R*)-2-Hydroxyisocaproat, 2: (*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA, 3: (*E*)-2-Isocaprenoat, 4: (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA

(*E*)-2-Isocaprenoyl-CoA reagiert zunächst mit Asp171 zu einem kovalenten Intermediat unter Freisetzung des CoAS⁻-Anions. (*R*)-2-Hydroxyisocaproat greift nun dieses Intermediat an,

was zu einem neuen, kovalenten Intermediat führt, wobei (*E*)-2-Isocaprenoat freigesetzt wird. Das CoAS⁻-Anion reagiert nun mit dem Enzym-Anhydrid-Intermediat, wodurch (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA gebildet und Asp171 regeneriert wird.

5.2 Der Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

Während des Aktivierungsprozesses überträgt der Aktivator unter ATP-Hydrolyse ein Elektron auf die Dehydratase. Um die postulierten Nukleotid- und redoxabhängigen Konformationsänderungen (Kim *et al.*, 2007; Locher *et al.*, 2001) zu untersuchen, wurde der Aktivator aus *C. difficile* biochemisch charakterisiert und unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von verschiedenen Nukleotiden kristallisiert. Insgesamt konnten drei Strukturen gelöst werden: der reduzierte Aktivator mit ADP, der reduzierte Aktivator mit dem hydrolysestabilen ATP-Analogon ADPNP sowie der reduzierte Aktivator ohne Nukleotid. Die Analyse dieser Strukturen sollte Einblicke in den Aktivierungsmechanismus geben.

5.2.1 Proteinreinigung des Aktivators

Der Aktivator wurde unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von ADP, ADPNP oder ohne Nukleotid gereinigt (siehe Abschnitt 4.2.1). Bei Anwesenheit eines Nukleotids führte die Reinigung mittels Affinitätschromatographie zu einer mehr als 95 %igen Reinheit mit einer Ausbeute von durchschnittlich 3,3 mg Protein pro Gramm Nasszellgewicht. Erfolgte die Reinigung ohne Nukleotid war sowohl die Reinheit vermindert als auch die Ausbeute um mehr als die Hälfte reduziert. Ebenso war die Stabilität des Proteins deutlich geringer, so dass es innerhalb kürzester Zeit nach Beendigung der Reinigung zur Präzipitation kam. Die Strukturen des Aktivator^{red,ADP}, Aktivator^{red,ADPNP} und Aktivator^{red,Nf} zeigen, dass die Monomere des Nukleotid-freien Aktivators eine andere Tertiärstruktur aufweisen als mit gebundenem Nukleotid, da die Domänen I und II einen anderen Winkel einschließen. Diese konformationelle Änderung könnte Ursache für die veränderte Stabilität des Proteins und somit für die verminderte Ausbeute sein.

5.2.2 Oxidation und Reduktion des Aktivators

Die Oxidation des Aktivators erfolgte mit Thioninacetat. Das resultierende Spektrum weist eine ausgeprägte Schulter im Bereich von 400 nm und eine leichte Schulter bei 320 nm auf

(vgl. Abbildung 4-4), was auf ein oxidiertes [4Fe-4S]-Zentrum hindeutet (Lippard & Berg, 1995). Dass kein richtiges Maximum bei 400 nm ausgebildet wurde, kann auf unvollständige Oxidation zurückzuführen sein. Die nachfolgende Reduktion durch Natriumdithionit führte zum Verschwinden der Schulter bei 400 nm, was zu einer Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums passt. Gleichzeitig verschwand die Schulter bei 320 nm und es entstand eine neue Schulter im Bereich von 360 nm.

Bei der erstmaligen Charakterisierung des Aktivators durch Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2005) wurde bei dem Spektrum der oxidierten Form ebenfalls ein Maximum bei 400 nm beobachtet. Anders als in dieser Arbeit verschwand das Maximum durch die Reduktion nicht vollständig, sondern wurde zu einer Schulter. Eine Schulter bei 360 nm wurde damals bei der reduzierten Form nicht beobachtet. Spektroskopische Untersuchungen an dem Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* haben gezeigt, dass das Enzym mittels Titan(III)citrat in den superreduzierten Zustand ($[4\text{Fe-4S}]^0$) überführt werden kann (Hans *et al.*, 2008). Das entsprechende Absorptionsspektrum weist im Bereich von 360 nm eine deutliche Schulter auf, während im Bereich von 400 nm keine Schulter mehr sichtbar ist. Dies deutet darauf hin, dass sich der reduzierte Aktivator in dieser Arbeit zumindest teilweise im superreduzierten Zustand befand. Dass dies bei der Charakterisierung des Aktivators durch Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2005) nicht beobachtet wurde, kann in unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen und Inkubationszeiten begründet sein.

5.2.3 Die Struktur des reduzierten Aktivators mit ADP

Topologie des Monomers. Aufgrund seiner Topologie gehört der Aktivator zur Actin-Faltungsfamilie und besitzt die für diese Proteinklasse typischen zwei Kerndomänen (Domäne I und Subdomäne IIa). Die Topologie jeder Kerndomäne besitzt die Struktur $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, wobei die zweite α -Helix in Domäne I nicht richtig ausgeprägt ist.

Oligomerer Zustand und das [4Fe4S]-Zentrum. Der Aktivator lag sowohl in Lösung (vgl. Abschnitt 4.3.4) als auch im Kristall als Homodimer vor. An der relativ kleinen Dimerkontaktfläche befindet sich das [4Fe-4S]-Zentrum, der von je zwei Cysteinen aus jedem Monomer koordiniert wird und somit die Monomere verbrückt. Die Analyse mit dem PISA-Server ergab, dass das Dimer nur stabil ist, sofern das Fe/S-Zentrum vorhanden ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das kristallographische Dimer dem biologischen Dimer entspricht.

Das [4Fe-4S]-Zentrum ist darüber hinaus nicht im Inneren des Proteins verborgen, sondern

sitzt direkt in der Dimerkontaktfläche. Zwar ist es auf der Oberseite durch die Aminosäuren Thr165 und Val166 von jedem Monomer gegenüber dem Lösungsmittel geschützt, doch auf der Unterseite ist es exponiert und somit frei zugänglich für das Solvens. Diese Tatsache kann die extreme Sauerstoffempfindlichkeit erklären. Da das Fe/S-Zentrum essentiell für die Dimerisierung ist, führt seine Zerstörung durch Luftsauerstoff unmittelbar zur Destabilisierung des Dimers und somit zur Präzipitation. Folglich besitzt das Fe/S-Zentrum wahrscheinlich zwei Funktionen: zum einen dient es der Dimerisierung und zum anderen dem Transfer eines Elektrons auf die Dehydratase (Buckel *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Die niedrigen *B*-Faktoren in den Subdomänen IIa und IIb zeigen, dass der Mittelteil des Aktivator-Dimers geringe Flexibilität besitzt.

Nukleotidbindung. Jedes Monomer besitzt eine Nukleotidbindungsstelle, die sich im Spalt zwischen den beiden β -Faltblättern befindet. Das Nukleotid wird durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen von dem Protein gebunden. Ein Mg^{2+} -Ion ist fast perfekt oktaedrisch vom β -Phosphat sowie von fünf Wassermolekülen koordiniert (Abbildung 4-8). Die Annahme, dass es sich bei dem Ion tatsächlich um ein Mg^{2+} -Ion handelt wird neben den erwähnten Hinweisen in Abschnitt 4.2.4 durch zwei weitere Fakten gestützt. Zum einen war $MgCl_2$ sowohl während der Reinigung als auch während der Kristallisation anwesend. Zum anderen wurde auch in Strukturen von weiteren Mitgliedern der Actin-Faltungsfamilie an dieser Position ein divalentes Kation gefunden, je nach Kristallisationsbedingung Mg^{2+} oder Ca^{2+} (Flaherty *et al.*, 1994; Schuler, 2001). Da die bisher publizierte Struktur eines Aktivators aufgrund der Auflösung von 3 Å keine Wassermoleküle und Ionen enthält (vgl. Abbildung 1-4) (Locher *et al.*, 2001), gewährt die hier diskutierte Struktur einen detaillierteren Einblick in die Interaktionen des Nukleotids.

Redoxzustand. Während der Kristallisation sowie beim Ernten der Kristalle wurden stets definierte, reduzierende Bedingungen verwendet. Die Ergebnisse der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie von aufgelösten Kristallen deuten darauf hin, dass sich der Aktivator in den gefrorenen Kristallen im reduzierten Zustand befand (vgl. Abschnitt 4.2.4). Folglich entspricht die diskutierte Struktur derjenigen des reduzierten Aktivators.

Unter der Voraussetzung, dass das jeweils gebundene Nukleotid keinen Einfluss auf das Redoxpotenzial des Fe/S-Zentrums hat, kann angenommen werden, dass sich das Enzym in den Kristallen des Aktivators^{red,ADPNP} und des Aktivators^{red,Nf} ebenfalls im reduzierten Zustand befand. Daher gehe ich davon aus, dass die resultierenden Strukturen den reduzierten

Zustand des Enzyms repräsentieren.

5.2.4 Strukturelle Folgen der Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums

Die erste und bislang einzige publizierte Struktur eines Aktivators ist die des Aktivators der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *A. fermentans* mit gebundenem ADP (Locher *et al.*, 2001). Weder während der Reinigung noch während der Kristallisation wurden Reduktionsmittel eingesetzt. Für den Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase wurden gezeigt, dass sich das Protein im oxidierten Zustand befindet, wenn während der Reinigung keine Reduktionsmittel wie Natriumdithionit oder Titan(III)citrat eingesetzt werden (Kim *et al.*, 2007). Somit ist davon auszugehen, dass die Struktur des Aktivators der (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase den oxidierten Zustand repräsentiert (Aktivator^{ox,ADP}). Zur Verdeutlichung, dass dieser nicht aus *C. difficile* ist, wird er im Folgenden als *af*-Aktivator^{ox,ADP} bezeichnet. Der Aktivator aus *A. fermentans* und der Aktivator aus *C. difficile* weisen eine Sequenzidentität von 52 % auf.

Die Gesamtstruktur des *af*-Aktivators^{ox,ADP} ist derjenigen des Aktivators^{red,ADP} sehr ähnlich, d.h. beide Enzyme sind Homodimere, wobei die Monomere über ein [4Fe-4S]-Zentrum verbunden sind. Darüber hinaus findet man bei einem Monomer des *af*-Aktivators^{ox,ADP} die gleiche Topologie wie bei einem Aktivator^{red,ADP}-Monomer (Abbildung 5-3). Überlagert man die Monomere, so erhält man für korrespondierende C_α-Atome eine *r.m.s.*-Abweichung von 1,1-1,3 Å.

Auch bei dem *af*-Aktivator^{ox,ADP} ist in jedem Monomer ein ADP-Molekül im Spalt zwischen den β-Faltblättern nicht-kovalent gebunden. Sowohl die Position als auch die Orientierung des Nukleotids ist bei den beiden Aktivatorformen fast identisch (Abbildung 5-3). Die Interaktionen von ADP mit dem Protein bei dem *af*-Aktivator^{ox,ADP} stimmen bis auf zwei Ausnahmen mit denen überein, die für den Aktivator^{red,ADP} beschrieben wurden (Abschnitt 4.2.4). Zum einen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem Aspartat und den vicinalen Hydroxygruppen der Ribose beim *af*-Aktivator^{ox,ADP} nicht zu finden. Zum anderen befindet sich an der Stelle, an der beim Aktivator^{red,ADP} Arg218 mit dem Adeninteil interagiert, beim *af*-Aktivator^{ox,ADP} das Gln220.

Wie bereits erwähnt enthält das Modell des *af*-Aktivators^{ox,ADP} keine Wassermoleküle oder Ionen. Dennoch kann basierend auf der Ähnlichkeit der Strukturen angenommen werden, dass sich das Mg²⁺-Ion bei dem *af*-Aktivator^{ox,ADP} an der gleichen Position befindet wie bei dem Aktivator^{red,ADP}.

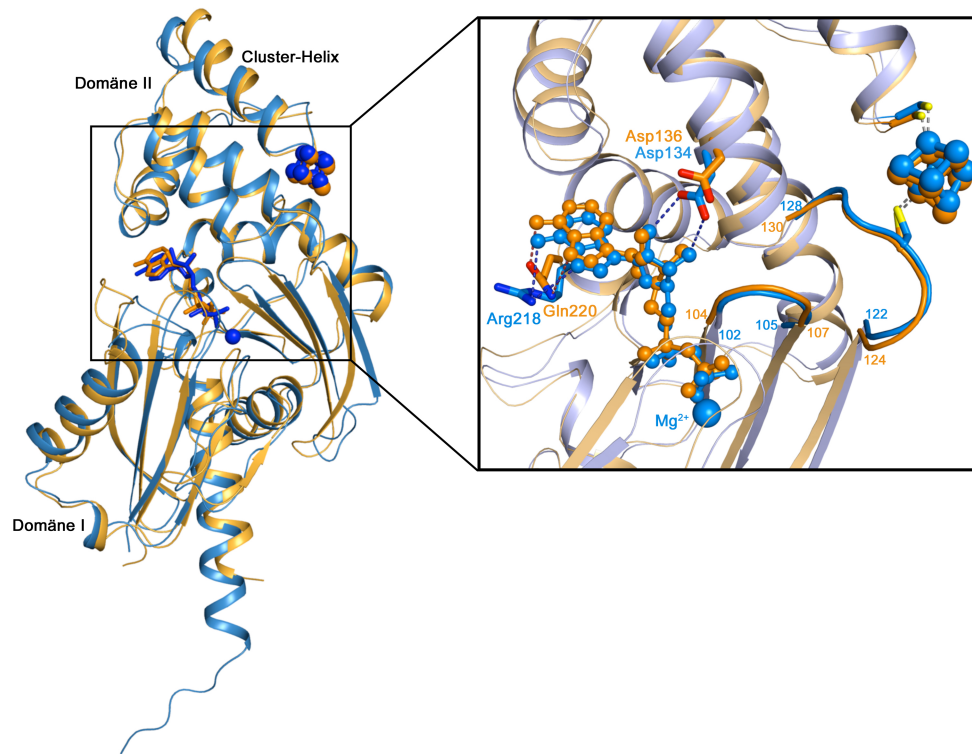


Abbildung 5-3: Überlagerung der Monomere des *af*-Aktivators^{ox,ADP} (orange, PDB-Nummer: 1HUX) und des Aktivators^{red,ADP} (blau). Die Proteine sind als Bändermodell gezeigt, ADP als Stäbchenmodell, Mg^{2+} als Kugel und die Fe/S-Zentren als Kugel- und Stäbchenmodell. Die Vergrößerung zeigt die Nukleotidbindungsstelle mit ADP als Kugel- und Stäbchenmodell und ausgewählte Aminosäuren als Stäbchenmodell (Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau und Schwefelatome gelb). Die Zahlen geben die Nummern der entsprechenden Aminosäuren an. Die Bereiche, die die Phosphatbindestelle mit dem Fe/S-Zentrum verbinden, sind hervorgehoben. Unterbrochene Linien deuten koordinative Bindungen (grau) bzw. Wasserstoffbrückenbindungen (entsprechend dem zugehörigen Enzym orange oder blau) an.

Das [4Fe-4S]-Zentrum ist bei dem *af*-Aktivator^{ox,ADP} wie auch bei dem Aktivator^{red,ADP} auf der Proteinoberseite vor dem Lösungsmittel durch ein Threonin und ein Valin von jedem Monomer geschützt. Auf der gegenüberliegenden Seite ist das Fe/S-Zentrum Solvens-exponiert. Die Helix-Cluster-Helix-Winkel des *af*-Aktivators^{ox,ADP} ($102,7^\circ$) und des Aktivators^{red,ADP} ($95,6^\circ$) sind sich sehr ähnlich. Weiterhin ist auch die Position der Bereiche, die das [4Fe-4S]-Zentrum mit der β -Phosphatgruppe verbinden (bei dem Aktivator^{red,ADP} Aminosäuren 102-105 und 122-128), in beiden Aktivatorformen identisch (Abbildung 5-3). Basierend auf der Annahme, dass die Struktur des *af*-Aktivators^{ox,ADP} tatsächlich die oxidierte Form des Aktivators repräsentiert, zeigt der strukturelle Vergleich mit dem Aktivator^{red,ADP} jedoch, dass die Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums keine signifikanten Konformationsänderungen zur Folge hat, insbesondere nicht im zentralen Teil des Homodimers um das Helix-Cluster-Helix-Motiv. Die geringen strukturellen Unterschiede können auf die unterschiedlichen Quellorganismen zurückgeführt werden.

5.2.5 Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen des reduzierten Aktivators

Struktureller Vergleich des Aktivators^{red,ADP} mit dem Aktivator^{red,ADPNP}. Die Topologie der Monomere der beiden Aktivatorformen ist sehr ähnlich und sogar die Positionierung der Seitenketten ist von wenigen Ausnahmen abgesehen bei beiden Strukturen fast gleich. Die *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C_α-Atome liegt im Bereich von 0,38-0,63 Å. Überlagert man die Domänen einzeln, so ergibt sich für die C_α-Atome der Domäne I eine *r.m.s.*-Abweichung von 0,33-0,40 Å und für die C_α-Atome der Domäne II liegt die *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C_α-Atome im Bereich von 0,19-0,41 Å. Aus der Überlagerung von Domäne II ist ersichtlich, dass sich durch die Bindung von ADPNP Domäne I um ca. 1 ° auf Domäne II zubewegt, wobei Helix 2 als Drehachse dient (Abbildung 5-4).

ADP und ADPNP sind fast identisch gebunden, wobei das ATP-Analogon ca. 0,5 Å näher an Domäne II liegt. Die Orientierung des Adenin- und Riboseteils sowie die der α- und β-Phosphatgruppe unterscheidet sich bei ADP und ADPNP kaum und auch die Interaktionen mit dem Protein sind weitgehend identisch (siehe Abschnitte 4.2.4 und 4.2.5). Im aktiven Zentrum ist das Mg²⁺-Ion fast an der gleichen Stelle lokalisiert. Es ist in beiden Fällen oktaedrisch koordiniert, jedoch handelt es sich bei den Liganden bei dem Aktivator^{red,ADP} um die β-Phosphatgruppe sowie fünf Wassermoleküle, während bei dem Aktivator^{red,ADPNP} eines der Wassermoleküle durch die γ-Phosphatgruppe des Nukleotids ersetzt ist. Durch die Bindung von ADPNP bewegt sich der *loop*, der die Aminosäuren 9-12 umfasst. Hierdurch bewegt sich die Hydroxygruppe von Ser10 um 2,2 Å auf die γ-Phosphatgruppe zu und koordiniert die β,γ-Imidogruppe sowie ein Sauerstoffatom der γ-Phosphatgruppe des Nukleotids. An der Stelle, wo sich die Hydroxygruppe von Ser10 im Aktivator^{red,ADPNP} befindet, ist beim Aktivator^{red,ADP} ein Wassermolekül lokalisiert. Weiterhin bewegt sich durch die ADPNP-Bindung der *loop* der Aminosäuren 102-105 auf die γ-Phosphatgruppe zu, wodurch die Amidstickstoffatome von Gln103 und Asp104 in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu einem Sauerstoffatom der γ-Phosphatgruppe gelangen. Außerdem befindet sich nun das Amidstickstoffatom von Gln103 in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu der Hydroxygruppe von Ser10. Durch die beschriebenen Bewegungen von Ser10, Gln103 und Asp104 wird die γ-Phosphatgruppe in einer fest definierten Position gehalten (vgl. Abbildung 4-13).

Die *loops* der Aminosäuren 102-105 und 122-128 verbinden die β-Phosphatgruppe mit dem

[4Fe-4S]-Zentrum. Letzterer Bereich, in dem Cys125 liegt, welches das Fe/S-Zentrum koordiniert, ist in beiden Strukturen fast identisch. Auch das Wassermolekül, das an der Unterseite des Proteins das Fe/S-Zentrum koordiniert, ist in beiden Strukturen zu finden.

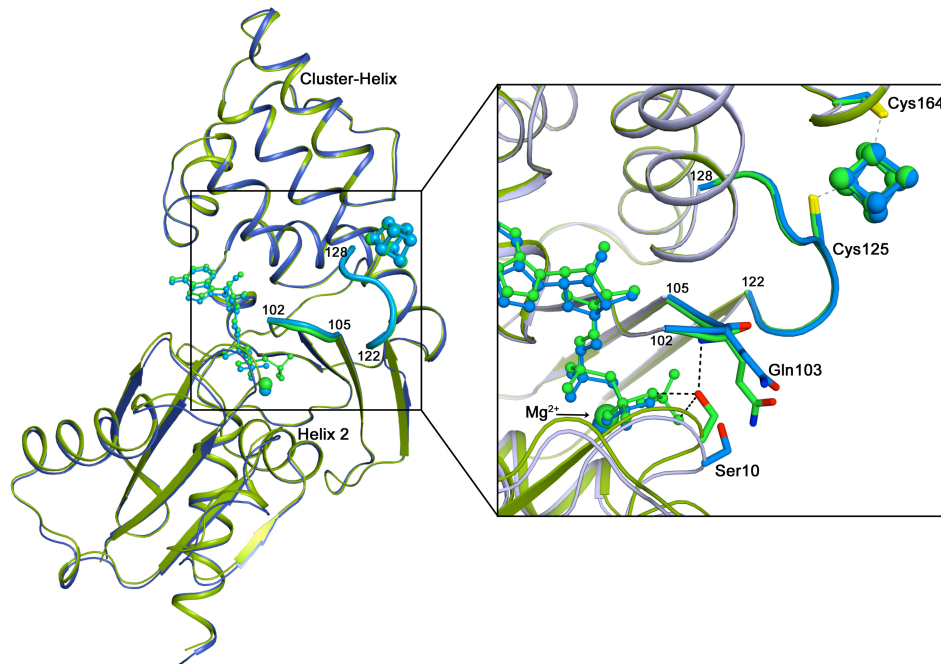


Abbildung 5-4: Überlagerung von Monomeren des Aktivators^{red,ADP} (blau) und des Aktivators^{red,ADPNP} (grün). Die Nukleotide und Fe/S-Zentren sind als Stäbchen- und Kugelmodell dargestellt, Mg^{2+} -Ionen sind als Kugeln gezeigt. Die *loop*-Bereiche, die die Nukleotidbindungsstelle mit dem Fe/S-Zentrum verbinden (Gly102-Ala105, Asn122-Gly128), sind hervorgehoben. Die Zahlen geben die Nummer der jeweiligen Aminosäure an. Die Vergrößerung zeigt die Nukleotidbindungsstelle. Die das Fe/S-Zentrum koordinierenden Cysteine sowie Aminosäuren, deren Position sich aufgrund der ADPNP-Bindung ändert, sind als Stäbchenmodell gezeigt (Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau, Schwefelatome gelb). Wasserstoffbrückenbindungen und koordinative Bindungen sind durch unterbrochene Linien in schwarz bzw. grau angedeutet.

Darüber hinaus weisen die Gesamtstrukturen der beiden Aktivatorformen – insbesondere im Mittelteil des Dimers – kaum konformationelle Unterschiede auf. Die Helix-Cluster-Helix-Winkel sind fast gleich ($95,6^\circ$ bei dem Aktivator^{red,ADP}, $98,7^\circ$ bei dem Aktivator^{red,ADPNP}).

Der Austausch von ADP durch das ATP-Analogon ADPNP führt folglich nur zu kleineren konformationellen Änderungen. Zwar bewegt sich Domäne I etwas auf Domäne II zu, was sehr wahrscheinlich durch die für die ATP-Hydrolyse notwendige, definierte Positionierung der γ -Phosphatgruppe zu erklären ist, doch bleiben der Bereich des Helix-Cluster-Helix-Motivs und die unmittelbare Umgebung des [4Fe-4S]-Zentrums so gut wie unverändert. Ist ADPNP gebunden, so befindet sich zwar durch die dritte Phosphatgruppe eine zusätzliche negative Ladung in der Nukleotidbindungsstelle, doch hat dies aufgrund der Entfernung zum Fe/S-Zentrum vermutlich keinen elektrostatischen Einfluss darauf. Eine Beeinflussung des

Redoxpotenzials des Fe/S-Zentrums durch den Nukleotidaustausch ist deshalb unwahrscheinlich.

Die offene und die geschlossene Form des reduzierten Aktivators. Bei dem Aktivator^{red,ADP} wird ADP sowohl von Aminosäuren der Domäne I als auch von Aminosäuren der Domäne II (und hier von Aminosäuren beider Subdomänen) koordiniert, so dass die zwei Domänen eng zusammen gehalten werden. Aus diesem Grund kann bei der Struktur des Aktivators^{red,ADP} von einer geschlossenen Form gesprochen werden. Da die Struktur des Aktivators^{red,ADPNP} nahezu identisch ist mit der des Aktivators^{red,ADP}, stellt auch sie die geschlossene Form dar. Bei der Nukleotid-freien Form handelt es sich hingegen um die offene Form, da sich im Vergleich zum Aktivator^{red,ADP} die Domäne I um ca. 40 ° nach außen bewegt, wobei Helix 2 als Drehachse dient (Abbildung 5-5). Helix 1 bewegt sich dabei um rund 19 Å. Bei der Überlagerung der Domäne II des Aktivators^{red,Nf} mit der des Aktivators^{red,ADP} bzw. Aktivators^{red,ADPNP}, ergeben sich für korrespondierende C_α-Atome *r.m.s.*-Abweichungen von 0,60-0,68 Å. Für Domäne I erhält man Werte im Bereich von 0,58-0,64 Å.

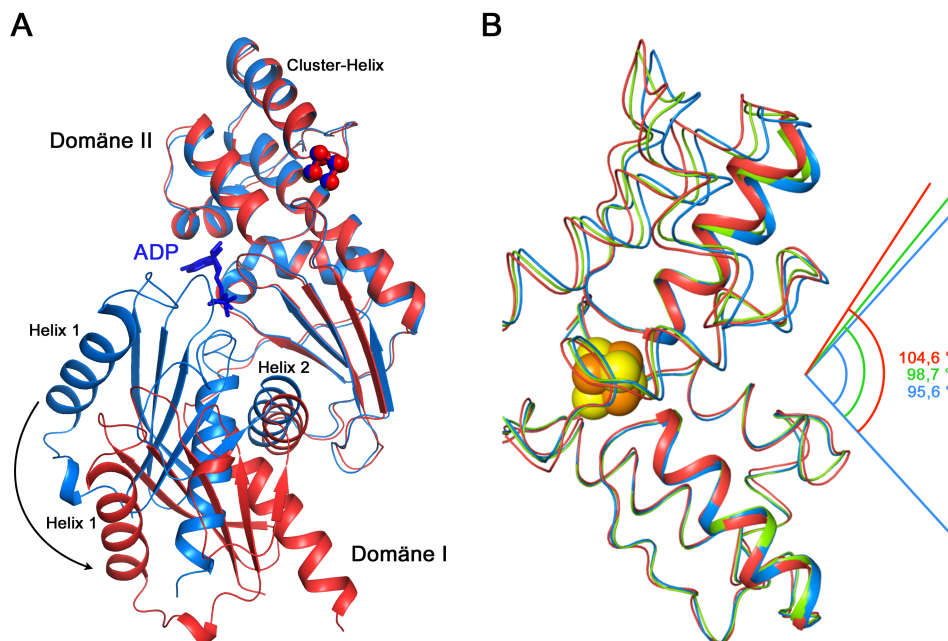


Abbildung 5-5: Die offene und die geschlossene Form des Aktivators. (A) Überlagerung des Aktivators^{red,ADP} (blau) mit dem Aktivator^{red,Nf} (rot) basierend auf den C_α-Atomen der Domäne II. ADP ist als Stäbchenmodell in blau gezeigt, das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Stäbchen- und Kugelmodell in der Farbe der jeweiligen Aktivatorform dargestellt. In Abwesenheit des Nukleotids dreht sich die Domäne I mit Helix 2 als Drehachse um ca. 40 °. (B) Vergrößerung des Helix-Cluster-Helix-Motivs. Zusätzlich ist der Aktivator^{red,ADPNP} (grün) überlagert. Das [4Fe-4S]-Zentrum ist als Kugelmodell dargestellt (Eisenatome in orange und Schwefelatome in gelb).

Der Mittelteil des Dimers, d.h. das [4Fe-4S]-Zentrum mit der Domäne II aus jedem Monomer, ist in allen drei Aktivatorformen fast gleich und die Helix-Cluster-Helix-Winkel unterscheiden sich kaum (Abbildung 5-5 B). Auch die unmittelbare Umgebung des Fe/S-Zentrums ist in allen drei Formen so gut wie identisch, d.h. zum einen ist das Zentrum auf der Proteinoberseite vor dem Lösungsmittel geschützt, während es auf der Unterseite zugänglich ist. Zum anderen gibt es keine strukturellen Unterschiede in den *loops*, die die Nukleotidbindungsstelle mit dem Fe/S-Zentrum verbinden. Weiterhin sind in allen drei Aktivatorstrukturen die *B*-Faktoren der C_α-Atome in Domäne I höher als in Domäne II. Somit bleibt der zentrale Teil des Dimers stets starr und unverändert, während Domäne I abhängig davon, ob kein Nukleotid, ADP oder ADPNP gebunden ist, unterschiedliche Positionen einnimmt. Die Nukleotidbindung und der Nukleotidaustausch haben offensichtlich keinen Einfluss auf das Redoxpotenzial des Fe/S-Zentrums. Dies stützt die Annahme, dass alle drei Aktivatorstrukturen den reduzierten Zustand beschreiben (vgl. Abschnitte 4.2.4 und 5.2.3).

5.2.6 Vergleich des reduzierten Aktivators mit Vertretern der Actin-Faltungsfamilie

Topologie. Viele Vertreter der Actin-Faltungsfamilie besitzen neben den zwei Kerndomänen noch weitere Domänen, die insbesondere zwischen s3 und s4, zwischen s4 und s5 und/oder zwischen s8 und s9 insertiert sind {Hurley, 1996 #41}. Der Aktivator weist neben den Kerndomänen I und IIa jedoch nur eine weitere Domäne auf, die Subdomäne IIb. Diese aus vier α -Helices bestehende Domäne ist zwischen s8 und s9 eingebaut.

Um Ähnlichkeiten und Unterschiede des Aktivators zu Vertretern der Actin-Faltungsfamilie zu untersuchen, wurden die Strukturen des Aktivators^{red,ADP} und des Aktivators^{red,ADPNP} mit Strukturen von Mitgliedern der Actin-Faltungsfamilie verglichen, die ebenfalls ein Nukleotid gebunden haben. Die Überlagerung eines Monomers des Aktivators^{red,ADP} mit Actin^{ADP} aus *Drosophila melanogaster* (PDB-Nummer: 2HF3, *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C_α-Atome 3,01 Å) (Rould *et al.*, 2006) und Hsc70^{ADP}, einem Vertreter der Hsp70-Familie, aus *Bos taurus* (PDB-Nummer 1NGA, *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C_α-Atome 2,55 Å) (Flaherty *et al.*, 1994) ist in Abbildung 5-6 gezeigt. Hieraus ist ersichtlich, dass sich die strukturellen Ähnlichkeiten auf die zwei β -Faltblätter und die unmittelbar umgebenden α -Helices beschränken, d.h. auf die zwei Kerndomänen.

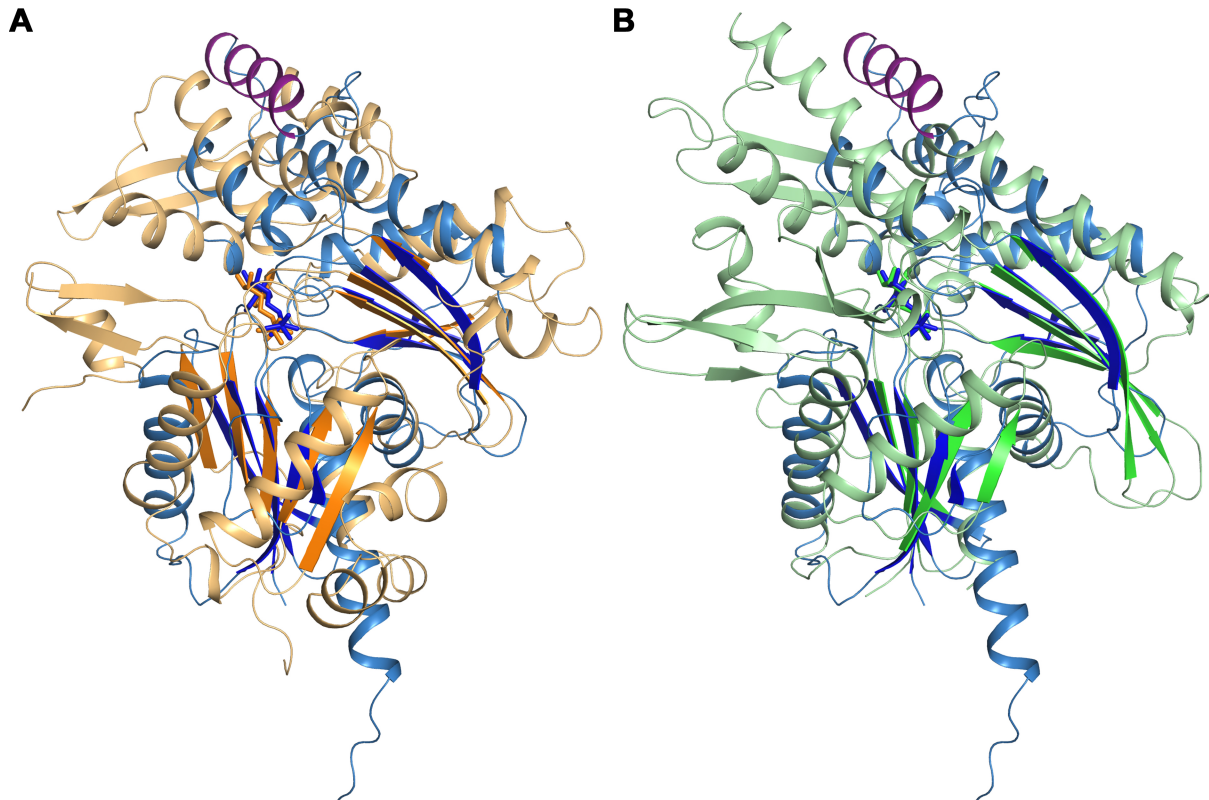


Abbildung 5-6: Überlagerung eines Aktivator^{red,ADP}-Monomers mit (A) Actin^{ADP} (PDB-Nummer: 2HF3) und (B) Hsc70^{ADP} (PDB-Nummer: 1NGA). Die Proteine sind als Bändermodell dargestellt, wobei der Aktivator in blau, Actin in orange und Hsc70 in grün gezeigt sind. Die für die Actin-Faltung typischen β -Faltblätter sind in kräftigeren Farben hervorgehoben, die Cluster-Helix des Aktivators in lila. ADP ist in der Farbe des zugehörigen Proteins als Stäbchenmodell gezeigt.

Bezieht man in die strukturellen Vergleiche weiterhin Pantothenatkinase aus *Staphylococcus aureus* (PDB-Nummer: 2EWS) (Hong *et al.*, 2006), Glycerinkinase aus *E. coli* (PDB-Nummer: 1GLB) (Hurley *et al.*, 1993) und Hexokinase aus *Sulfolobus tokodaii* (PDB-Nummer: 2E2Q) (Nishimasu *et al.*, 2007) mit ein, so bestätigt sich diese Beobachtung. Die *r.m.s.*-Abweichung korrespondierender C α -Atome für alle diese Strukturen liegt im Bereich von 2,6-3,4 Å. Beim Aktivator sind die meisten *loops* kürzer als bei den anderen Proteinen und einige α -Helices fehlen, so dass er eine Art Grundversion der Actin-Faltungsfamilie darstellt. Die zusätzlichen Domänen in den Vertretern der Actin-Faltungsfamilie dienen meist spezifischen Funktionen, so auch die Subdomäne IIb des Aktivators, da sie an der Bindung des Fe/S-Zentrums und an der Dimerisierung beteiligt ist (vgl. Abschnitt 4.2.4). Vergleiche der Aminosäuresequenz des Aktivators mit den Sequenzen der genannten Vertreter der Actin-Faltungsfamilie ergaben relativ geringe Sequenzidentitäten im Bereich von 10 – 22 %.

Neben den Gemeinsamkeiten weist der Aktivator jedoch einige strukturelle Merkmale auf, die ihn deutlich von anderen Mitgliedern der Actin-Faltungsfamilie unterscheiden. Zunächst enthält der Aktivator ein [4Fe-4S]-Zentrum, was bei keinem anderen Mitglied dieser

Faltungsfamilie zu finden ist. Außerdem ist der Bereich herauszustellen, der die Cluster-Helix umfasst, d.h. Subdomäne IIb. Zwar besitzen viele Mitglieder der Actin-Faltungsfamilie in diesem Bereich auch ausgedehnte Domänen, doch die Cluster-Helix des Aktivators ist einzigartig. Auch unterscheidet sich der Aktivator von anderen Proteinen der Actin-Faltungsfamilie darin, wie das Dimer gebildet wird. Da das Fe/S-Zentrum bei der Dimerisierung eine Rolle spielt sind all diese Merkmale miteinander verbunden.

Nukleotidbindung. Alle Mitgliedern der Actin-Faltungsfamilie besitzen im Spalt zwischen den beiden β -Faltblättern eine Bindungsstelle für ein Nukleotid sowie ein divalentes Kation. Auch beim Aktivator ist das Nukleotid (ADP oder ADPNP) an dieser Stelle lokalisiert und als divalentes Kation ist Mg^{2+} zu finden (vgl. Abbildung 4-8 und Abbildung 4-13). Sowohl die Position als auch die Orientierung des Nukleotids beim Aktivator sind mit Actin, Hsc70, Glycerinkinase, Hexokinase und Pantothenatkinase vergleichbar. Typisch für die Actin-Faltungsfamilie ist weiterhin, dass die Bindungsstelle für den Phosphatteil des Nukleotids aus den *loops* besteht, die den ersten und zweiten β -Strang in jeder Kerndomäne verbinden. Dies ist bei dem Aktivator ebenfalls zu finden (vgl. Abschnitt 4.2.4). In den Sequenzen dieser beiden Bereiche ist jeweils das Motiv Asp-Xxx-Gly zu finden (bei dem Aktivator: Asp7-Leu8-Gly9 und Asp99-Ile100-Gly101), das auch als Konsensussequenz in der Actin-Faltungsfamilie auftritt (Flaherty *et al.*, 1991; Hurley, 1996). Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen dem Aktivator und der Actin-Faltungsfamilie ist das Vorhandensein eines divalenten Kations, das oktaedrisch koordiniert wird und mit der β -Phosphatgruppe des Dinukleotids bzw. der β - und γ -Phosphatgruppe des Trinukleotids interagiert (vgl. Abbildung 4-8 und Abbildung 4-13).

Obwohl die Orientierung des Nukleotids in der Actin-Faltungsfamilie stets ähnlich ist, unterscheiden sich die einzelnen Vertreter in der Koordination des Basen- und Riboseteils. Vergleicht man die Reste des katalytischen Zentrums des Aktivators mit denen von anderen Vertretern der Actin-Faltungsfamilie, so stellt man insbesondere Ähnlichkeiten zu Hsc70 und Actin fest (Tabelle 5-1). Für Hsc70 konnte gezeigt werden, dass für die Katalyse Asp10 und Asp199 essentiell sind (Flaherty *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1993; Wilbanks *et al.*, 1994). An äquivalenten Positionen sind auch im Aktivator saure Reste zu finden (Asp7 und Asp99), ebenso bei Actin (Asp11 und Asp154). Beide Aminosäuren sind an der Koordinierung von Wassermolekülen beteiligt, die mit dem Magnesiumion interagieren (Abbildung 4-8 A). Beim Aktivator und bei Actin kontaktiert ein Lysin die α - und β -Phosphatgruppe, während sich an der entsprechenden Position bei Hsc70 ein Cystein befindet. Dort wo das N-Atom des Lysin

im Aktivator bzw. in Actin lokalisiert ist, ist bei Hsc70 ein Kaliumion zu finden (Wilbanks & McKay, 1995). Eine weitere Variante existiert in der Glycerinkinase und der Pantothenatkinase, wo die α -Phosphatgruppe von einem Arginin koordiniert wird. Ist im Aktivator das Trinukleotid gebunden, so wird die γ -Phosphatgruppe neben dem Mg^{2+} -Ion auch von der Hydroxygruppe von Ser10 und den Amidstickstoffatomen von Gly101 und Gly102 koordiniert. Bei Actin interagiert ebenfalls ein Serin mit der γ -Phosphatgruppe (Ser14), während bei Hsc70 ein Threonin an dieser Stelle zu finden ist (Thr13). Dafür sind bei Hsc70 zwei Glycine weitere Interaktionspartner der γ -Phosphatgruppe (Gly202 und Gly203), während es bei Actin ein Glycin und ein Aspartat sind (Gly156 und Asp157).

Vergleicht man bei Hsc70 die Strukturen, die MgADP und MgADPNP gebunden haben, so sind die Nukleotide wie bei dem Aktivator gleich gebunden, d.h. die Konformationen der Base, der Ribose und des α - und β -Phosphats unterscheiden sich kaum und die Unterschiede beschränken sich auf den Bereich des γ -Phosphates (Flaherty *et al.*, 1994).

Tabelle 5-1: Korrespondierende Aminosäuren, Ionen und Moleküle im aktiven Zentrum des Aktivators und Vertretern der Actin-Faltungsfamilie. In Klammern sind die PDB-Nummern der Strukturen angegeben, die für die Analyse verwendet wurden.

Aktivator	Actin (2HF3, 1ATN, 1YAG)	Hsc70 (1NGA, 3LDL)	Hexokinase (2E2Q)	Glycerinkinase (1GLB)	Pantothenatkinase (2EWS)
Asp7	Asp11	Asp10	Asp8	Asp10	Asp6
Ser10	Ser14	Thr13	Thr12	Thr13	Gly9
Lys14	Lys18	Cys17, K^+	Lys15	Arg17	Arg27
Asp99	Asp154	Asp199	Asp95	Gln246	Asn96
Lys106	His161	Asp206	Substrat	Substrat	Substrat
Glu79	Gln137	Glu175			

Nukleotid-abhängige Konformationsänderungen. Bei Vertretern der Actin-Faltungsfamilie scheint es ähnlich wie bei den G-Proteinen (Sprang, 2000) mindestens zwei große Konformationsänderungen zu geben. Eine Änderung findet nach der Freisetzung des γ -Phosphates nach erfolgter Hydrolyse des Nukleotids statt, die andere nach der Freisetzung von ADP.

Für Actin und Hsc70 wurde gezeigt, dass sie in der geschlossenen Form vorliegen, wenn sie ADP oder ADPNP gebunden haben (Flaherty *et al.*, 1994; Graceffa & Dominguez, 2003;

Otterbein *et al.*, 2001). Die offene Form wurde bei DnaK beobachtet, ein zu Hsc70 homologes Protein aus Bakterien, wenn es kein Nukleotid besitzt und an den Nukleotidaustauschfaktor GrpE gebunden ist (Harrison *et al.*, 1997), ebenso bei Nukleotid- und Glukose-freier Hexokinase (Anderson *et al.*, 1978) und Nukleotid-freiem Arp2 und Arp3 (Robinson *et al.*, 2001). Eine Ausnahme zu dem beschriebenen Schema stellt die Nukleotid-freie Struktur von MreB dar. Dieses Protein, das in der Regulierung der Zellform von *Bacillus subtilis* eine Rolle spielt, liegt ohne Nukleotid in der geschlossenen Form vor (van den Ent *et al.*, 2001). Offensichtlich ist das Öffnen der Domänen zwar wahrscheinlicher, wenn kein Nukleotid gebunden ist, doch kann sich unter gewissen Bedingungen das Protein auch ohne Nukleotid in der geschlossenen Form befinden.

Die Strukturen von ADP- und ATP-gebundenem Hsc70 weisen zwar keine größeren konformationellen Unterschiede auf (Flaherty *et al.*, 1994), doch sind die zwei Nukleotid-Zustände durch unterschiedlich hohe Substrataffinitäten charakterisiert. Passend hierzu wurde mittels Röntgenstreuexperimenten in Lösung eine konformationelle Änderung nach der Freisetzung des γ -Phosphates nachgewiesen (Wilbanks *et al.*, 1995). Auch bei Actin spiegelt sich die Variabilität der Proteineigenschaften in Abhängigkeit von gebundenen Liganden in Lösung nicht in den Strukturen wider, die mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurden (Überblick in (Schuler, 2001)). Die meisten der Strukturen zeigen Actin in der geschlossenen Form. Es konnte lediglich beobachtet werden, dass die Freisetzung des γ -Phosphates dazu führt, dass in der DNase I-Bindungsstelle in Subdomäne 2 ein ungeordneter *loop* in eine geordnete α -Helix übergeht (Schuler, 2001).

Der reduzierte Aktivator wurde in dieser Arbeit durch drei Strukturen charakterisiert, die das generelle Schema einer offenen und einer geschlossenen Form bestätigen (vgl. Abschnitt 5.2.5). In Abwesenheit eines Nukleotids ist die Bindungsstelle offen, sobald ADP oder ADPNP gebunden ist, schließt sie sich. Ähnlich wie bei Hsc70 konnten bei den Nukleotid-gebundenen Formen abgesehen von kleinen Änderungen im aktiven-Zentrum keine großen strukturellen Unterschiede festgestellt werden. Jedoch deuten Chelatisierungsexperimente mit Bathophenanthrolindisulfonat darauf hin, dass es nach der Freisetzung des γ -Phosphates zu Konformationsänderungen kommt (Kim *et al.*, 2007). Das Fehlen von strukturellen Unterschieden des Aktivators^{red,ADP} und des Aktivators^{red,ADPNP} außerhalb des aktiven Zentrums könnte ein kristallographisches Artefakt sein. Die Zusammensetzung der Reservoirlösung war in beiden Fällen sehr ähnlich und die hohe Salzkonzentration könnte dazu geführt haben, dass immer der gleiche Zustand kristallisiert wurde. Somit würden die Strukturen nicht die Flexibilität in Lösung widerspiegeln.

5.2.7 Der Aktivierungsprozess

Basierend auf der Struktur des *af*-Aktivators^{ox,ADP} (Locher *et al.*, 2001) und Chelatisierungsexperimenten (Kim *et al.*, 2007) sowie in Analogie zu dem Nitrogenasesystem wurde der in Abschnitt 1.3.1 beschriebene Aktivierungsmechanismus vorgeschlagen. Die Strukturen des Aktivators^{red,ADP}, des Aktivators^{red,ADPNP} und des Aktivators^{red,Nf} bestätigen die vorgeschlagenen Konformationsänderungen jedoch nicht. Abbildung 5-7 zeigt ein Schema des Aktivierungsmechanismus, das auf den diskutierten Aktivatorstrukturen (vgl. Abschnitte 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6, 5.2.3, 5.2.4 und 5.2.5) und Gelfiltrationsexperimenten (vgl. Abschnitt 4.3.4) beruht. Da beim Aktivator zwischen einer offenen und einer geschlossenen Form unterschieden wird, ist der Zwei-Domänen-Aufbau der Monomere dargestellt. Im Grundzustand, d.h. wenn das Fe/S-Zentrum oxidiert und ADP gebunden ist, befinden sich die Monomere in der geschlossenen Form (vgl. Abschnitt 5.2.4). Mit Hilfe eines Ferredoxins oder Flavodoxins (bzw. Natriumdithionit *in vitro*) kann das [4Fe-4S]-Zentrum des Aktivators reduziert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2). Zwar verkleinert sich der Helix-Cluster-Helix-Winkel um 7 °, doch insgesamt bleibt die Struktur, insbesondere der mittlere Teil des Dimers, unverändert (vgl. Struktur des Aktivators^{red,ADP}, Abschnitt 5.2.4).

Verlässt ADP die Nukleotidbindungsstelle, so verlieren die Domänen I und II ihren festen Zusammenhalt und Domäne I schwingt nach außen, wobei der mittlere Teil des Dimers weiterhin unverändert bleibt (vgl. Struktur des Aktivators^{red,Nf}, Abschnitte 4.2.6 und 5.2.5). Die Bindung von ADPNP führt schließlich dazu, dass die Monomere wieder in die geschlossene Form wechseln (vgl. Struktur des Aktivators^{red,ADPNP}, Abschnitte 4.2.5 und 5.2.5). Für Hsc70 wurde gezeigt, dass die Bindung von ADPNP und ATP identisch ist (Flaherty *et al.*, 1994). Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch bei dem Aktivator die ADPNP-gebundene Struktur der ATP-gebundenen Struktur entspricht.

Bislang ist ungeklärt, ob die beschriebene Reihenfolge tatsächlich so auftritt. Ebenso gut ist es möglich, dass vom Grundzustand ausgehend, zunächst ADP die Bindungsstelle verlässt bevor ATP bindet und schließlich das Fe/S-Zentrum reduziert wird. Strukturen des oxidierten, Nukleotid-freien Aktivators und des oxidierten, ATP-gebundenen Aktivators existieren bisher nicht. Dennoch ist anzunehmen, dass in Analogie zu dem reduzierten Aktivator der oxidierte Aktivator in der offenen Form vorliegt, wenn kein Nukleotid gebunden ist und sich die Monomere bei ATP-Bindung schließen.

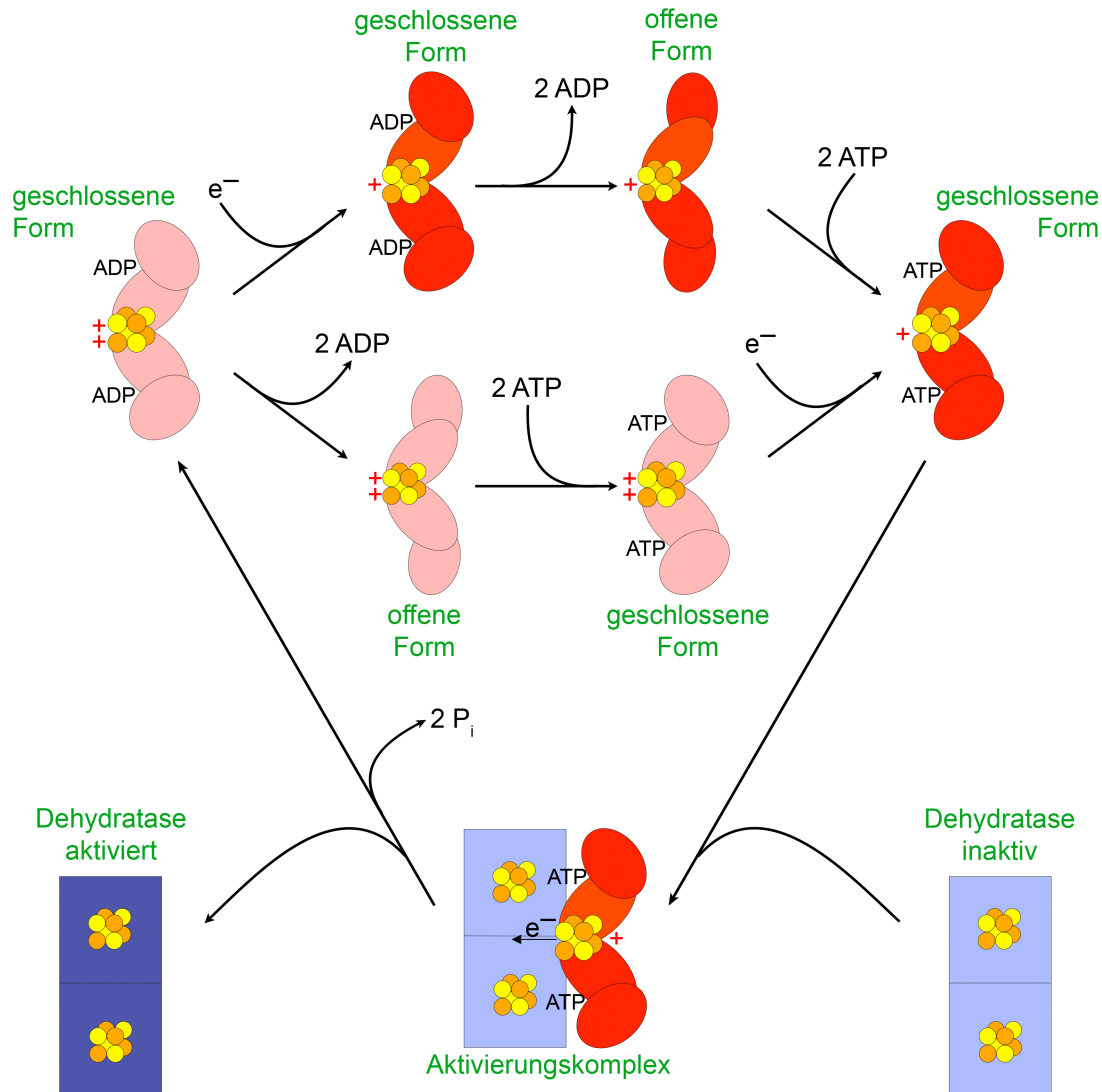


Abbildung 5-7: Struktur-basiertes Schema für die Aktivierung der Dehydratase durch den Aktivator. Der Aktivator ist in rot dargestellt, die Dehydratase in blau. Helle Farben repräsentieren den oxidierten Zustand, dunkle Farben den reduzierten Zustand.

Hat der reduzierte Aktivator schließlich ATP gebunden, so kann er mit der Dehydratase den Aktivierungskomplex bilden. Zwar deuten die Strukturen des Aktivator^{red,ADPNP} und des Aktivator^{red,ADP} darauf hin, dass der Austausch von ADP durch ADPNP bzw. ATP im reduzierten Aktivator keine signifikanten konformationellen Änderungen zur Folge und somit offensichtlich keine Auswirkung auf das Redoxpotenzial des Fe/S-Zentrums hat (vgl. Abschnitt 5.2.5), doch zeigen Gelfiltrationsexperimente, dass die Dehydratase in der Lage ist zwischen den beiden Nukleotidzuständen zu unterscheiden und nur mit dem Aktivator^{red,ADPNP} einen stabilen Aktivierungskomplex zu bilden (vgl. Abschnitt 4.3.4). Ist ADP anwesend, so kann dieser Komplex nicht beobachtet werden, da er entweder nicht gebildet wird oder aber aufgrund der schwachen Affinität der Komponenten während der Gelfiltration nicht stabil ist. Auch in Gegenwart des Übergangszustandsanalogons $ADP \cdot AlF_4^-$ kann der reduzierte

Aktivator mit der Dehydratase einen Komplex bilden. Die Komplexbildung mittels $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ ist in Übereinstimmung mit den Daten von Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2010), die Komplexbildung mit ADPNP wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt. Das Verhältnis der Absorptionsgipfel in den Chromatogrammen der Komplexansätze weist darauf hin, dass die Komplexbildung mit ADPNP effektiver verläuft als mit dem Übergangszustandsanalogon. Im Aktivierungskomplex überträgt der Aktivator schließlich ein Elektron auf eines der beiden $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentren der Dehydratase unter gleichzeitiger Hydrolyse von ATP. ATP-Hydrolyse ist notwendig, da das Redoxpotenzial der Dehydratase mit einem Wert von $< -600 \text{ mV}$ deutlich negativer als das des Aktivators ($E_0' \geq -350 \text{ mV}$) ist. Die aus der Hydrolyse von zwei Mol ATP stammende Energie reicht aus, um das Redoxpotenzial des Aktivators auf circa -850 mV zu erniedrigen, so dass ein Elektronentransfer auf die Dehydratase möglich ist.

Sobald die Dehydratase aktiviert ist, dissoziiert der Aktivator ab und sie kann bis zu 10.000 Umsätze katalysieren bevor eine erneute Aktivierung notwendig ist. Da in einer aktiv wachsenden, anaeroben Zelle das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Ferredoxin in etwa 1 beträgt und die ATP-Konzentration im Bereich von 2-5 mM liegt, befindet sich der Aktivator wahrscheinlich immer in der ATP-gebundenen, reduzierten Form und kann jederzeit ein Elektron auf die Dehydratase übertragen (Kim *et al.*, 2007).

Die Aktivatorstrukturen zeigen, dass weder die Reduktion des Fe/S-Zentrums noch der Austausch von ADP durch ATP zu signifikanten Konformationsänderungen führt. Dies steht im Gegensatz zu den Daten der Chelatisierungsexperimente (Kim *et al.*, 2007), wobei auch diese nur Indizien für die vorgeschlagenen Konformationsänderungen sind. So könnten die Unterschiede in den Chelatisierungsraten in den verschiedenen Redox- und Nukleotidzuständen auf eine veränderte Stabilität des Fe/S-Zentrums im jeweiligen Zustand zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt spiegeln die Strukturen von Actin und Hsc70 in den unterschiedlichen Nukleotidzuständen, die mittels Röntgenkristallographie gelöst wurden, nicht die konformationelle Flexibilität der Proteine in Lösung wider (vgl. Abschnitt 5.2.6). Möglicherweise ist die hohe Ähnlichkeit des Aktivators^{red,ADP} und des Aktivators^{red,ADPNP} ein kristallographisches Artefakt. Die Struktur des *af*-Aktivators^{ox,ADP} wurde unter anderen Kristallisationsbedingungen erhalten. Dass die Strukturen des Aktivators^{red,ADP} und des Aktivators^{red,ADPNP} dennoch fast identisch mit der des *af*-Aktivators^{ox,ADP} sind, ist ein Indiz dafür, dass diese Nukleotid-gebundenen Formen nicht diejenigen sind, die den Komplex mit der Dehydratase bilden können, sondern die freie Form des Aktivators repräsentieren. Sollte es im Laufe der Aktivierung tatsächlich zu strukturellen Änderungen kommen, so ist es

wahrscheinlich, dass diese in Domäne I und an den C-terminalen Enden von Helix 3 und der Cluster-Helix auftreten, da diese Bereiche höhere *B*-Faktoren aufweisen (vgl. Abbildung 4-8). Der Schlüssel zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus auf molekularer Ebene ist die Struktur des Aktivierungskomplexes. Versuche, diese Struktur mittels Röntgenkristallographie aufzuklären waren jedoch nicht erfolgreich (vgl. Abschnitt 4.3.6). Zwar führten zahlreiche Kristallisationsansätze mit verschiedenen Komplexbildungsansätzen (ADPNP, $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ und ADP und VO_4^{3-}) zu Kristallen, doch enthielten diese stets nur den Aktivator. Von einem der Kristalle wurde ein Datensatz aufgenommen und es zeigte sich, dass sich in der asymmetrischen Einheit ein Aktivatorhomodimer befand. Die Monomere hatten weder ADP noch AlF_4^- gebunden und lagen in der offenen Form vor. Zwar ist der Winkel zwischen den Domänen circa 10° kleiner als beim Aktivator^{red,Nf}, doch ist die Topologie der Domänen fast identisch, weshalb auf eine weitere Diskussion der Struktur verzichtet wird.

Basierend auf der Struktur der Dehydratase kann dennoch festgehalten werden, dass der Elektronentransfer strukturell möglich ist, da das $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrums des Aktivators exponiert ist und die kürzeste Distanz zwischen jedem der Fe/S-Zentren der Dehydratase und der Proteinoberfläche 11 \AA beträgt (vgl. Abschnitt 4.3.7). Ein denkbarer Mechanismus für die Komplexbildung ist das sogenannte *conformational sampling* bzw. die “konformationelle Selektion” (Boehr & Wright, 2008). Hierbei kann der Aktivator in jedem Nukleotid/Redox-Zustand in mehreren Konformationen vorliegen, die im dynamischen Gleichgewicht sind, wobei die Population jedes einzelnen Zustandes von der relativen, freien Energie des jeweiligen Zustandes abhängt. Die Dehydratase-Oberfläche dient als starres Modell, das nun von den unterschiedlichen Konformationen des Aktivators in den verschiedenen Nukleotid- und Redoxzuständen abgetastet wird. Ein stabiler Komplex bildet sich nur zwischen der “richtigen” Konformation des reduzierten Aktivators mit ATP und der Dehydratase aus. Die “richtige” Konformation kann hierbei ohne weiteres nur schwach populiert sein. Die Änderung der Proteinumgebung, in diesem Fall hervorgerufen durch Bindung an die Dehydratase, ändert die Populationsverteilung in dem konformationellen Ensemble (Boehr & Wright, 2008). In diesem Fall läge der freie Aktivator^{red,ADPNP} überwiegend in der “falschen” Konformation vor, was eine Erklärung dafür wäre, dass nur diese Form kristallisierte.

Die konformationelle Selektion wird auch bei der Komplexbildung von Elektronentransferproteinen beobachtet (Leys *et al.*, 2003; Miyashita *et al.*, 2004; Page *et al.*, 2003; van Amsterdam *et al.*, 2002) und beispielsweise auch für die Komplexbildung des Fe-Proteins und des MoFe-Proteins der Nitrogenase angenommen (Tezcan *et al.*, 2005). Im

Allgemeinen kommt sie auch bei Protein-Protein-Assoziationsreaktionen vor (Boehr & Wright, 2008; Gabdoulline & Wade, 2002; Ma *et al.*, 1999).

5.2.8 ATP-Hydrolyse

Die strukturelle Ähnlichkeit des Aktivators zu anderen Proteinen der Actin-Faltungsfamilie legt die Vermutung nahe, dass der Mechanismus der ATP-Hydrolyse ähnlich verläuft. Bei den meisten Phosphotransferasen handelt es sich hierbei um einen *in-line*-Mechanismus (Fersht, 1999), bei dem ein nukleophiler Angriff auf die γ -Phosphatgruppe erfolgt. Im Fall von Actin, Hsc70 und dem Aktivator ist das angreifende Nukleophil entweder ein Hydroxydion oder ein Wassermolekül, während es bei den Zuckerkinasen das Substrat ist.

Bei der Struktur von Hsc70^{ATP} wurde kein Wassermolekül gefunden, das in der richtigen Position ist, damit ein *in-line*-Angriff stattfinden kann (Flaherty *et al.*, 1994). Das Mg²⁺-Ion wird außerdem nur vom β -, nicht aber vom γ -Phosphat koordiniert. Basierend auf der Struktur mit ADP und P_i (Flaherty *et al.*, 1994) wird angenommen, dass es zu einer Reorientierung der γ -Phosphatgruppe kommt, so dass diese nun auch mit dem Mg²⁺-Ion wechselwirkt. Hierdurch gelangt ein Wassermolekül, das von Lys71 koordiniert wird, in die richtige Position für einen *in-line*-Angriff. Da dieses Lysin essentiell für die Aktivität ist (O'Brien *et al.*, 1996), wird diese Hypothese gestützt. In dem vorgeschlagenen Mechanismus spielt das Mg²⁺-Ion eine entscheidende Rolle, da es an der Positionierung des γ -Phosphates beteiligt ist. Somit sind auch die Aminosäuren, die das hydratisierte Mg²⁺-Ion koordinieren wichtig für die Katalyse, was durch Mutationsstudien belegt ist (Huang *et al.*, 1993; O'Brien & McKay, 1993; Wilbanks *et al.*, 1994). Anders als bei Hsc70 wird in der Struktur von Actin^{ATP} (Vorobiev *et al.*, 2003) das Mg²⁺-Ion sowohl vom β - als auch vom γ -Phosphat koordiniert. Außerdem befindet sich an der Stelle des Lys71 von Hsc70 ein Methylhistidin-loop. Ein Wassermolekül, das als Nukleophil dienen könnte, wird von Gln137 koordiniert.

Bei der Struktur des Aktivators^{red,ADPNP} ist das Nukleotid wie bei Actin^{ATP} bereits so orientiert, dass das β - und γ -Phosphat mit dem Mg²⁺-Ion interagieren (vgl. Abbildung 4-13). Zwar ist kein Wassermolekül in der richtigen Position für einen *in-line*-Angriff, doch befinden sich in der Umgebung des γ -Phosphates drei Wassermoleküle, die als mögliche Nukleophile für die ATP-Hydrolyse in Frage kommen (Abbildung 5-8). Jedes der drei Wassermoleküle ist in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu einem Sauerstoffatom des γ -Phosphates. W1 interagiert darüber hinaus mit Asp99 und Asp104, W2 interagiert mit Asp104 und Gln103 und W3 wird von Glu79 und Tyr65 koordiniert.

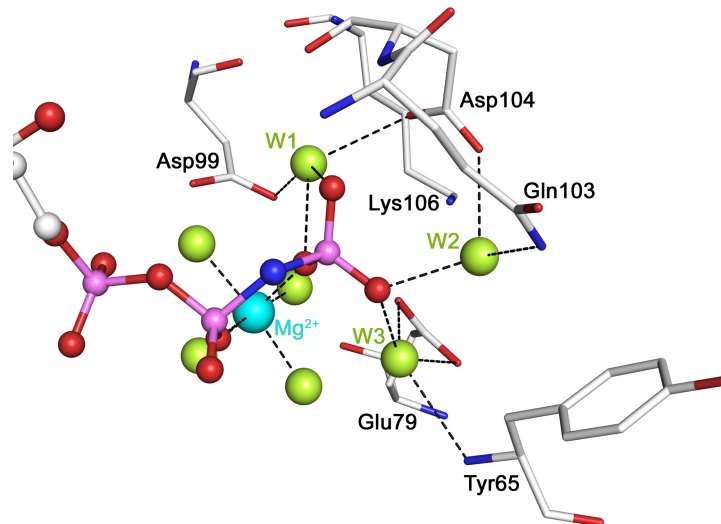


Abbildung 5-8: Aktives Zentrum des reduzierten Aktivators mit gebundenem ADPNP. Ausgewählte Aminosäuren sind als Stäbchenmodell gezeigt, das Nukleotid als Kugel- und Stäbchenmodell (Kohlenstoffatome sind weiß, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot, Phosphoratom lila). Wassermoleküle und das Mg^{2+} -Ion sind als grüne bzw. türkise Kugeln dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch schwarz gestrichelte Linien angedeutet. Mit W1-W3 sind die Wassermoleküle bezeichnet, die für den nukleophilen Angriff während der ATP-Hydrolyse in Frage kommen.

Eine Aussage darüber, welches Wassermolekül das wahrscheinlichste Nukleophil darstellt, kann nicht getroffen werden. Eine zu Lys71 von Hsc70 korrespondierende Aminosäure ist beim Aktivator nicht zu finden, jedoch ist auf dem gegenüberliegenden β -Strang ein anderes Lysin lokalisiert (Lys106), das an der Positionierung des Nukleophils beteiligt sein könnte.

Bezüglich des aktiven Zentrums scheint der Aktivator somit eine Mischung aus Actin und Hsc70 zu sein. Die Koordination des hydratisierten Mg^{2+} -Ions ist in allen drei Enzymen sehr ähnlich, insbesondere die zwei Aspartatreste sind stets vorhanden. Da die Positionierung des Ions bei Hsc70 offenbar essentiell für die Katalyse ist, trifft dies wahrscheinlich auch für Actin und den Aktivator zu. Auch wenn die Positionierung eines potenziellen Nukleophils in den verschiedenen Enzymen stets etwas anders ist, könnte der ATPase-Mechanismus mittels eines nukleophilen *in-line*-Angriffs ähnlich verlaufen.

5.2.9 Vergleich des Aktivators mit dem Eisen-Protein der Nitrogenase

Im Prozess der biologischen Stickstofffixierung katalysiert das Nitrogenase-System die ATP-abhängige Reduktion von N_2 zu der metabolisch nutzbaren Form von NH_3 (zusammengefasst in (Burgess & Lowe, 1996; Howard & Rees, 1994; Igarashi & Seefeldt, 2003; Rees &

Howard, 2000)). Die Nitrogenase besteht aus zwei Komponenten, dem Fe-Protein und dem MoFe-Protein. Während das MoFe-Protein die Bindungsstelle für N_2 enthält und die eigentliche Reduktion katalysiert, koppelt das Fe-Protein die Hydrolyse von ATP an den Transfer eines Elektrons auf das MoFe-Protein.

Der in Abschnitt 5.2.7 vorgestellte Aktivierungsprozess der (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen basiert auf der funktionellen Ähnlichkeit des Aktivators zum Fe-Protein der Nitrogenase. Diese besteht darin, dass beide Proteine zunächst von einem Ferredoxin bzw. Flavodoxin reduziert werden, bevor sie einen an ATP-Hydrolyse gekoppelten Ein-Elektronentransfer zu einem spezifischen Partnerprotein katalysieren, wobei pro Elektron zwei Moleküle ATP hydrolysiert werden (Hans *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Rees & Howard, 2000; Thamer *et al.*, 2003). Strukturell weisen die beiden Enzyme sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede auf, die im Folgenden diskutiert werden.

Ihnen ist zunächst gemein, dass es sich in beiden Fällen um Homodimere mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa handelt, die ein [4Fe-4S]-Zentrum besitzen, das die Monomere miteinander verbrückt (Georgiadis *et al.*, 1992; Jang *et al.*, 2000). Während der Aktivator aufgrund seiner Topologie jedoch der Actin-Faltungsfamilie zugeordnet wird, gehört das Fe-Protein zu der Familie der *nucleotide switch proteins* (Sprang, 1997), die auch Guaninnukleotidbindungs (G)-Proteine umfasst (Abbildung 5-9). Bei den *nucleotide switch proteins* besteht ein Monomer aus einer einzigen Domäne mit gemischter α,β -Topologie und es gibt zwischen den Monomeren mehr Kontakte als beim Aktivator.

Im Fe-Protein wird das [4Fe-4S]-Zentrum wie im Aktivator von je zwei Cysteinen aus einem Monomer koordiniert und ist am N-terminalen Ende einer Helix aus jedem Monomer lokalisiert (Cluster-Helix). Das Fe/S-Zentrum ist auf einer Seite vor dem Solvens geschützt, während es auf der gegenüberliegenden Seite exponiert ist. Anders als bei dem Aktivator gibt es bei dem Fe-Protein jedoch sechs potenzielle $NH\cdots S$ -Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Schwefelatomen des Fe/S-Zentrums und den Hauptkettenatomen der Aminosäuren am N-terminalen Ende der Cluster-Helix.

Beide Enzyme weisen eine MgADP- bzw. MgATP-Bindungsstelle pro Monomer auf, unterscheiden sich aber sowohl in deren Position als auch in den Protein-Nukleotid-Interaktionen. Beim Fe-Protein befindet sich die Bindungsstelle an der Dimerkontaktfläche, wobei das Nukleotid hauptsächlich nur von Aminosäuren eines Monomers koordiniert wird. Ist ATP gebunden, so interagiert das γ -Phosphat mit einem Lysin des anderen Monomers. Zwar bindet das Nukleotid wie beim Aktivator auch nicht direkt am [4Fe-4S]-Zentrum, sondern ist etwa 20 Å davon entfernt, doch ist die Nukleotidbindungsstelle mit dem Zentrum

über eine Region verbunden, die bei den G-Proteinen als *switch II*-Region bezeichnet wird (Howard & Rees, 1994). Diese interagiert mit dem γ -Phosphat des Nukleotids und ändert nach der Hydrolyse die Konformation (Georgiadis *et al.*, 1992; Jang *et al.*, 2000; Schindelin *et al.*, 1997; Tezcan *et al.*, 2005). Da die *switch II*-Region auch einen der Cysteinreste beinhaltet, welcher das [4Fe-4S]-Zentrum koordiniert, wirken sich Konformationsänderung dieser Region auch auf das Fe/S-Zentrum aus.

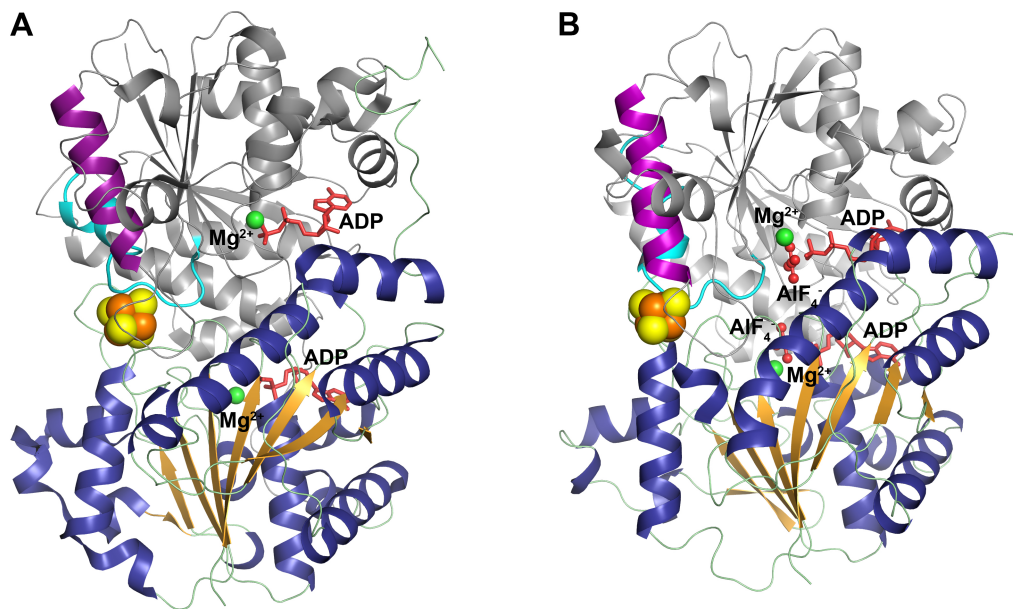


Abbildung 5-9: Bänderdarstellung des Fe-Proteins der Nitrogenase aus *A. vinelandii* mit (A) ADP (PDB-Nummer: 1FP6) und (B) ADP*AlF₄⁻ (PDB-Nummer: 1N2C). Ein Monomer ist entsprechend der Sekundärstruktur gefärbt (α -Helices in blau, β -Stränge in gelb und *loop*-Bereiche in grün), das zweite Monomer ist in grau gezeigt, wobei die Cluster-Helix in lila und die *switch II*-Region in türkis hervorgehoben sind. ADP ist als Stäbchenmodell in rot gezeigt, AlF₄⁻ als rotes Kugel- und Stäbchenmodell und das Mg²⁺-Ion sowie das [4Fe-4S]-Zentrum als Kugeln (Mg²⁺ grün, Eisen orange, Schwefel gelb).

Die Analyse des Nitrogenasekomplexes, der mittels ADP*AlF₄⁻ bzw. AMPPCP stabilisiert wurde (Schindelin *et al.*, 1997; Tezcan *et al.*, 2005), deutet darauf hin, dass die Konformationen des *switch II*-Bereichs, die durch ATP-Bindung und während der ATP-Hydrolyse erzeugt werden, zu einer Vergrößerung des Helix-Cluster-Helix-Winkels führen. Der Helix-Cluster-Helix-Winkel beträgt im Fe-Protein mit gebundenem ADP (PDB-Nummer: 1FP6) 147 °, im Fe-Protein mit AMPPCP (PDB-Nummer: 2AFK) 159 ° und im Fe-Protein mit ADP*AlF₄⁻ (PDB-Nummer: 1N2C) 171 °. Die Änderung des Winkels führt folglich zu einer Positionsänderung des Fe/S-Zentrums, so dass sich dieses im Komplex auf das MoFe-Protein zubewegt. Die reduzierte Distanz erleichtert nun den Elektronentransfer zwischen den Proteinen. Somit dient die ATP-Hydrolyse in diesem Fall der Regulierung des unidirektionalen Elektronentransfers durch konformationelle Änderungen des Proteins.

Anders als beim Aktivator findet bei der Nitrogenase die ATP-Hydrolyse jedoch nur im transienten Komplex statt; das isolierte Fe-Protein ist inaktiv. Der Aktivator hingegen besitzt auch ohne Dehydratase ATPase-Aktivität, auch wenn diese durch die Anwesenheit der Dehydratase deutlich gesteigert wird (Kim *et al.*, 2005). Dafür bildet das Fe-Protein mit dem MoFe-Protein stets einen Komplex, d.h. unabhängig davon, ob kein Nukleotid, ADP, AMPPCP oder ADP*AlF₄⁻ gebunden ist (Schindelin *et al.*, 1997; Tezcan *et al.*, 2005), wobei die Bindungsstelle am MoFe-Protein je nach Form des Fe-Proteins leicht variiert (Schindelin *et al.*, 1997; Tezcan *et al.*, 2005). Eine Komplexbildung des Aktivators mit der Dehydratase konnte nur in Gegenwart von ADPNP oder ADP*AlF₄⁻ beobachtet werden, nicht aber wenn ADP anwesend war. Eine gewisse Analogie zu der *switch II*-Region ist auch im Aktivator zu finden, denn dort ist das Fe/S-Zentrum über zwei *loop*-Regionen mit dem Phosphatteil des Nukleotids verbunden (siehe Abschnitt 4.2.4). Hier zeigen die Strukturen mit gebundenem ADP bzw. ADPNP jedoch kaum konformationelle Unterschiede. Insgesamt bleibt der zentrale Teil um das Helix-Cluster-Helix-Motiv von der Art des Nukleotids unbeeinflusst. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Fe-Protein mit dem ATP-Analogen bzw. dem Übergangszustandsanalogon stets im Komplex mit dem MoFe-Protein kristallisiert wurde, während die Kristallisation des Aktivators^{red,ADPNP} ohne Dehydratase erfolgte.

Das Nitrogenasesystem unterscheidet sich von den (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen deutlich in der Energiebilanz. Zwar werden in beiden Fällen für den Transfer eines Elektrons zwei Moleküle ATP hydrolysiert, doch kann die Dehydratase nach der Aktivierung durch ein Elektron bis zu 10.000 Umsätze katalysieren, bevor eine neue Aktivierung notwendig ist (Kim *et al.*, 2005). Dies ist energetisch sinnvoll, da der Stoffwechselweg der Energiegewinnung dient (Kim *et al.*, 2004). Im Nitrogenasesystem hingegen werden für die Reduktion von einem Mol N₂ zu zwei Mol Ammoniak acht Elektronen benötigt, d.h. es müssen pro Umsatz mehrere Zyklen von Komplexbildung und ATP-Hydrolyse stattfinden (Simpson & Burris, 1984) und die Elektronen stehen nach der erfolgten Umsetzung nicht mehr zur Verfügung. In einem aktiv Stickstoff fixierenden Organismus kann das Nitrogenasesystem bis zu 40 % des gesamten von der Zelle synthetisierten ATP verbrauchen (Daesch & Mortenson, 1968).

5.2.10 Konservierte Aminosäuren und homologe Proteine

In Abbildung 5-10 sind die Aminosäuresequenzen von 15 Proteinen verglichen, die zu dem Aktivator der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus *C. difficile* homolog sind.

Diskussion

[illegible]

		80	*	100	*	120	▼	*	140	
<i>C.difficile</i>	HadI	D L K K V V T G Y G M N	---	Y S D A D K Q I S E L S C H A R G V N F I I E T R	---	T I I D I G G Q D A K V L K L D N N G R I L N F M	:	121		
<i>A.fermentans</i>	HgdC	D M E F T L A T G Y G R N S	---	L E G I A D K Q M S E L S C H A M G A F I V N V H	---	T V I D I G G Q D V K V I H V - E N G T M T N F M	:	123		
<i>C.botulinum</i>	HgdC	D I E K T V T G Y G R I Q	---	Y K D A D K Q I S E L S C H A K G V A F I L G A R	---	T I I D I G G Q D A K A M K L N G K T K L I N F M	:	121		
<i>C.symbiosum</i>	HgdC	D N A Y T L A T G Y G R T S L	-	M D G I A D K Q M S E L S C H A K G A T F L F N V H	---	T V I D I G G Q D V K V L H I - D N G A M T N F M	:	125		
<i>C.sporogenes</i>	FldI	D I D Y I V S T G Y G R N S	---	Y D F A N K Q I S E L S C H A K G V Y E D N N K A R	---	T V I D I G G Q D I K V L K L A D S G R L L N F M	:	124		
<i>C.novyi</i>	FldI	D M D K I V A T G Y G R F A	---	I E E A D K Q I S E I S C H A K G I F E L V T A R	---	T I I D I G G Q D A K A I L D K N G V K Q F M	:	121		
<i>C.saccharolyticum</i>	XXX	E I T S V Y A T G Y G R K L	---	L K N A D G E M S E L S C H A R G V H H L L E V R	---	T I I D I G G Q D A K I L S L G A D G R L A E F M	:	121		
<i>F.nucleatum</i>	HgdC	E L Q G A T A T G Y G R N S	---	L A E V P - A Q M S E L S C H A K G A Y F L F N V H	---	S I I D I G G Q S K A K I L D D G N M L E N F M	:	125		
<i>E.coli</i>	YjIj	T P P F I T I T G Y G R Q L	---	V D F A D K Q V T E I S C H G L G A F L A T R	---	A V I D I G G Q S K V I Q L D D D G N L C D F M	:	118		
<i>E.albertii</i>	HgdC	N I H W V C A T G Y G R N S	---	L A I A N K E V S E L S C H S K G A N F L F G V R	---	T V I D I G G Q D V K A L H M D G K G R L N F M	:	124		
<i>E.yurii</i>	FldI	D I K A T V T G Y G R T T	---	Y Q G A D K Q I S E L S C H A K G V N F I E D A H	---	T V I D I G G Q A K V L K L D K T G R L S N F M	:	118		
<i>A.fulgidus</i>	HgdC	E V E R I V A T G Y G R N K	---	V G F A D K K V T E I S C H A R G A Y I F I T A R	---	T V V D I G G Q S K V I A L - E N K V A E F V M	:	120		
<i>R.palustris</i>	XXX	D V K F V V S T G Y G R E N	---	L P F A D K H V S E I T C H G I G M H L R N P D I R	---	T I L E I G G Q S K A I R I D D G G R V E Q F V M	:	121		
<i>M.genomosp.</i>	HgdC	D N A N I L S T G Y G R F N	---	V A Y A K G E I S E I T C H A K G A L F E C G T L	---	T I L D I G G Q D V K A I L K N G K M P M Q F M	:	121		
<i>M.barkeri</i>	OrfX	E I Q A L G T G Y G R F L I G T H F K A Q L I Q E	-	I T V N S K G A V Y L A D K Q K G N A T		T V I D I G G M N K A I S V - Q D C I P G M F T M	:	136		
<i>T.aromatica</i>	BrcD	D V D Y V A T T G E G S L	---	A F H T G H F Y S M T T H A R G A V Y L N E A R	---	A V L D I G A L H G R A I R N D E R G K V E T Y K M	:	126		

		▼ *	160	*	180	▼ *	200	*	
<i>C.difficile</i>	HadI	NDKCAAGTGRFLDVM	AKIIEVDVSE	GSISMNSQNEV	IS	STCTVFAESEVISH	SENAKIEDIVAGI	HTS : 192	
<i>A.fermentans</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	ANILEVKVSD	AEALGASKTRKVA	IS	STCTVFAESEVISH	SKETDKDIITAGI	HTRS : 194	
<i>C.botulinum</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	AGVLETVDSK	GEISEKSTKEV	IS	STCTVFAESEVISH	ANAKKEDIVAGI	HTS : 192	
<i>C.symbiosum</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	ARVLEVKVED	GRLGAMSRKKVG	IS	STCTVFAESEVISH	AMGTDKCDIIDGI	HTRS : 196	
<i>C.sporogenes</i>	FldI	NDKCAAGTGRFLDVM	SRVIEVPVDE	GKKALESKNPCT	IS	STCTVFAESEVISH	ARGVKTEDLIAG	ICKS : 195	
<i>C.novy</i>	FldI	NDKCAAGTGRFLDVM	SRVLEVLGD	MAEYDSRATPE	ASIS	STCTVFAESEVISH	SKGVAKENIAGV	HQS : 192	
<i>C.saccharolyticum</i>	XXX	NDKCAAGTGRFLDVM	AGILQRIED	EKQAAISKSTVK	IS	STCTVFAESEVISH	ANGVEIPDLVAG	ICQS : 192	
<i>F.nucleatum</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	IAKVLEVDLED	EKLDEKSTVDVA	IS	STCTVFAESEVISH	AKETKIEDILVKG	HTA : 196	
<i>E.coli</i>	YijL	NDKCAAGTGRFL	EVISRTLGTS	VEQDLSITEN	-VTPHAI	SMCTVFAESE	SAISLRSA	VAPEALILAGV	INA : 188
<i>E.albertii</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	SRVLETDIAE	AAQGAQSQKNVT	IS	STCTVFAESEVISH	ANNOPTIPIING	HTRS : 195	
<i>E.yurii</i>	FldI	NDKCAAGTGRFLDVM	ANVLETFVSK	GEELSEKSTKE	IS	NTCTVFAESEVISH	SSSEKIEDIVAG	IHAS : 189	
<i>A.fulgidus</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	AAALNKVEE	LGDAERATKATK	IS	STCTVFAESEVISH	SAEKEKVEDIVAG	IEHA : 191	
<i>R.palustris</i>	XXX	NDKCAAGTGRFL	EVTAAMG	LGSEASALARNPL	RSIS	STCTVFAETIE	IVSLVAVETPVP	PIIVRAVHDS : 192	
<i>M.genomosp.</i>	HgdC	NDKCAAGTGRFLDVM	SKVLEIPISD	MGWYFKSKNPAP	VSIS	STCTVFAESEVISH	LSKNPKEDIVAG	YHKS : 192	
<i>M.barkeri</i>	OrfX	GGICAGASG	FFEMISRLG	VDITELGALVKG	MHEHVSMS	SYCTVFEGTQSL	SVNSLRATPE	DVA	AAACYS : 208
<i>Taromatica</i>	BrcD	TSOCASGSG	GFENTARYL	GLADTEG	SLNSQADNPEV	VSIS	SICAVLAETD	IVNMVSRGITAP	INILKGHTIS : 197

		220	*	240	*	260	*	280	
<i>C.difficile</i>	HsdI	VAKRVSS-	LVKRIGV	QRNVMT	VGGVARN	SGIVRAM	REIN----	TEIIVDPIDP	LTGALGAAGIYAFDEAKE : 258
<i>A.fermentans</i>	HgdC	VASRVIG-	LANRVGIE	VKDVMVT	GGVAVQNY	GVRGALG	-----	VEIKTSPKLA	LYNGALGAAYAYKKAAK : 260
<i>C.botulinum</i>	HgdC	VVRRVST-	LAMRVGIE	DQVVMVT	GGVARNKG	GLVKAMEK	ELG----	HDIKVPLQA	LYNGALGAAYAFETETK- : 257
<i>C.symbiosum</i>	HgdC	VAHRVTG-	LAHRIGV	VPDVMVT	GGVAVQNE	GVVKALQ	DELG----	CPINTSPLT	LYNGALGAAILAWQAASR : 262
<i>C.sporogenes</i>	FldI	VASRVAS-	LAKRSGIE	EELVMSG	GVAKNIG	VVKMAE	ELG-----	RDIIYTSKNS	LYNGALGASLYAYESFQK : 261
<i>C.novyi</i>	FldI	VASKACG-	LAYRCGIE	EELVMSG	GVGVAQNA	GVVRAIE	KEIK-----	KPVIIVAPOT	VTGTAIGAAIFAYEABIK : 258
<i>C.saccharolyticum</i>	XXX	VASRVAS-	LAKRIGV	KETVCM	SGGVAKNG	GVVKAMB	QELG----	LEITYTPMA	OLMGALGAAYIAYDKSL- : 257
<i>Fnucleatum</i>	HgdC	IASRVGS-	LAKRIGIK	KDDVMVT	GGVALNKG	GMVRALRN	ELG-----	FKLHTNEYC	OLNGAIGAAIFAYQKYM : 262
<i>E.coli</i>	YijL	MARRSAN-	FIARLSCE	APIETGG	VSHCQF	ARMLESH	LR-----	MPVNTHPDA	CFAGATGAAVIYQQRVTR : 254
<i>E.albertii</i>	HgdC	VSGRIAG-	LAKRVGIE	EDPVMTT	GGVSRNFE	VVRVISE	EIG-----	ASVMTSPLS	LYNGAIGAAIYAWESYRQ : 261
<i>E.yurii</i>	FldI	VAKRVSS-	LAKRVGIE	EKVVMVT	VGGVAKNS	GVVREMS	KN-----	TKIIVPEFF	PLTGAALGAIFAYEYIK : 255
<i>A.fulgidus</i>	HgdC	IASRIAA-	MARRVKIE	PDIIVLT	GGVAKNK	AKWKALE	KEFG----	MEVKTPEP	PIVGAAGAILA----- : 251
<i>R.palustris</i>	XXX	IAQRAVV-	LLRQVGT	SGPVMGS	GGVALNS	GVVRALD	KTQ-----	TSIYIVDNP	QVRGAIGAAIYAQRLA-- : 256
<i>M.genomosp.</i>	HgdC	IASKASA-	LVRQGVG	EGSLTGT	GGGARDP	GVVDATK	SKEL-----	VEVKVADPH	QVIGALGAAILLAYEKIKK : 258
<i>M.barkeri</i>	OrfX	VVEQTYE	QQLEQV	IVKEPLT	IVGGSSLI	AGVPKAL	GLLEK-----	IDVLPENSH	LIYAVGAAILLSAGFVEE : 275
<i>Taromatica</i>	BrcD	TADRIAKL	LSVSGARD	GVVLCGG	ALLDEGL	LKLTNE	STOQEQKMAV	YAYNHPD	SPYAGATGAALWGAFR--- : 266

		*	300	
<i>C. difficile</i>	HadI	SQKEVKNI-----	:	266
<i>A. fermentans</i>	HgdC	-----	:	-
<i>C. botulinum</i>	HgdC	-----	:	-
<i>C. symbiosum</i>	HgdC	RQSNS-----	:	267
<i>C. sporogenes</i>	FldI	ERS-----	:	264
<i>C. novyi</i>	FldI	ANK-----	:	261
<i>C. saccharolyticum</i>	XXX	-----	:	-
<i>F. nucleatum</i>	HgdC	THQ-----	:	265
<i>E. coli</i>	YijL	R-----	:	255
<i>E. albertii</i>	HgdC	LKIKESEQGRIL	:	273
<i>E. yurii</i>	FldI	NNKSERSL----	:	263
<i>A. fulgidus</i>	HgdC	-----	:	-
<i>R. palustris</i>	XXX	-----	:	-
<i>M. genomosp.</i>	HgdC	-----	:	-
<i>M. barkeri</i>	OrfX	-----	:	-
<i>T. aromatica</i>	BcrD	-----	:	-

Abbildung 5-10: Sequenzalignment des Aktivators aus *C. difficile* (HadI) mit 15 homologen Proteinen. Hoch konservierte Reste sind schwarz, zu 80 % konservierte Reste sind grau hinterlegt. Die Pfeile markieren die Aminosäuren, die in HadI wahrscheinlich essentiell für die ATP-Hydrolyse sind (rot) sowie die Cysteine, die das [4Fe-4S]-Zentrum koordinieren (blau). Die lilafarbenen Balken kennzeichnen die Bereiche, die in HadI die Phosphatbindungsstelle mit dem Fe/S-Zentrum verbinden, der grüne Balken kennzeichnet die Cluster-Helix. HgdC: Aktivator der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, FldI: Aktivator der (R)-Phenyllactat-Dehydratase, BcrD: Untereinheit der Benzoyl-CoA-Reduktase, XXX, YijL und OrfX: unbekannte Funktion, *C. botulinum*: *Clostridium botulinum*, *C. novyi*: *Clostridium novyi*, *C. saccharolyticum*: *Clostridium saccharolyticum*, *E. albertii*: *Escherichia albertii*, *E. yurii*: *Eubacterium yurii*, *A. fulgidus*: *Archaeoglobus fulgidus*, *R. palustris*: *Rhodopseudomonas palustris*, *M. genomosp.*: *Megasphaera genomospecies*, *M. barkeri*: *Methanosarcina barkeri*, *T. aromatica*: *Thauera aromatica*

Die Auswahl der in das Alignment einbezogenen Proteine basiert auf dem Ergebnis einer BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1997) mit der Aminosäuresequenz des Aktivators aus *C. difficile* als Suchsequenz. Bei einigen der Proteine wurde bereits gezeigt, dass sie Funktionen ähnlich zu der des Aktivators besitzen, andere wiederum wurden bislang nicht charakterisiert. HgdC aus *A. fermentans*, HgdC aus *C. sporogenes* sowie FldI aus *F. nucleatum* wurden bereits als Aktivatoren von 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen beschrieben (Dickert *et al.*, 2002; Hans *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004; Klees *et al.*, 1992). Bei BcrD aus *T. aromatica* handelt es sich um eine Untereinheit der heterotetrameren Benzoyl-CoA-Reduktase (BCR) (Boll *et al.*, 2002). Zwei unterschiedliche Untereinheiten, darunter BcrD, besitzen Sequenzidentitäten von 29 % zu dem Aktivator aus *C. difficile*. Die Sequenzidentitäten der 15 Proteine zu dem Aktivator aus *C. difficile* liegen im Bereich von 28-68 %, wobei der Aktivator der (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus *C. botulinum* mit 68 % die höchste Sequenzidentität aufweist.

Zunächst ist auffällig, dass die Cysteine, die das [4Fe-4S]-Zentrum bei HadI koordinieren (Cys125 und Cys164) zu 100 % konserviert sind, was darauf hindeutet, dass alle Proteine ein [4Fe-4S]-Zentrum enthalten. Für HgdC aus *A. fermentans* und *F. nucleatum* sowie für FldI aus *C. sporogenes* wurde dies experimentell bestätigt. Ebenso sind die beiden Aminosäuren (Thr165 und Val166), die das Zentrum an der Oberseite gegenüber dem Solvens schützen,

relativ gut konserviert. An der Dimerisierung sind beim Aktivator aus *C. difficile* neben dem Fe/S-Zentrum und den Cysteinen auch Ala126, Arg131, Phe167 und Ser170 beteiligt, die alle ebenfalls hoch konserviert sind. Experimentell wurde für HgdC aus *A. fermentans* und *F. nucleatum* sowie für FldI aus *C. sporogenes* gezeigt, dass diese Proteine ebenfalls als Dimere vorliegen. Schließlich sind die Aminosäuren der Cluster-Helix (Reste 130-140 bei HadI) relativ hoch konserviert.

Die Phosphatbindungsstelle des Nukleotids ist beim Aktivator aus *C. difficile* durch die Sequenzmotive Gly5-Leu-Asp-Ile-Gly-Ser-Thr-Ala-Ser-Lys14 und Ile97-Ile-Asp-Ile-Gly101 definiert. Das Sequenzalignment zeigt, dass hieraus die Konsensussequenzen Gly-X-Asp-X-Gly-X₄-Lys und Ile/Val-X-Asp/Glu-Ile-Gly abgeleitet werden können. Die zwei Aspartatreste (Asp7 und Asp99 beim Aktivator aus *C. difficile*), die wahrscheinlich essentiell für die ATP-Hydrolyse sind (vgl. Abschnitt 5.2.6), sind zu 100 % konserviert. An der Position des Asp134, das beim Aktivator aus *C. difficile* mit den vicinalen Hydroxygruppen der Ribose interagiert, ist in den anderen Proteinen entweder ein Aspartat oder ein Glutamat zu finden, was darauf hindeutet, dass eine negative Ladung an dieser Stelle notwendig ist, um die Ribose in der korrekten Position zu halten. Ist ADPNP bzw. ATP gebunden, so koordiniert beim Aktivator aus *C. difficile* Ser10 das γ -Phosphat und positioniert es für die Hydrolyse. Ser10 ist mit Ausnahme von BcrD hoch konserviert; bei BcrD ist es durch ein Threonin ersetzt, welches jedoch wahrscheinlich die gleiche Funktion erfüllt. Beim Aktivator aus *C. difficile* verbinden die Bereiche der Aminosäuren 102-105 und 122-128 die Phosphatbindungsstelle mit dem Fe/S-Cluster. Auch diese sind abgesehen von BcrD aus *T. aromatica* hoch konserviert.

Das Alignment zeigt, dass insbesondere die funktional wichtigen Bereiche, d.h. die das Fe/S-Zentrum-koordinierenden Cysteinreste, die Reste an der Dimerkontaktfläche, die Cluster-Helix sowie die Nukleotidbindungsstelle und das aktive Zentrum der ATP-Hydrolyse hoch konserviert sind. Hieraus und aus den insgesamt hohen Sequenzidentitäten sowie der Ähnlichkeit der Strukturen der Aktivatoren aus *C. difficile* und *A. fermentans* lässt sich folgern, dass all diese Proteine wahrscheinlich eine ähnliche Struktur und einen ähnlichen Katalysemechanismus aufweisen. Somit kann der Aktivator aus *C. difficile* als Modell für diese Klasse an Enzymen angesehen werden.

Interessanterweise findet man homologe Proteine des Aktivators in vielen verschiedenen Organismen, wie die BLAST-Suche und das Sequenzalignment in Abbildung 5-10 gezeigt haben, angefangen von methanogenen Archaeen bis hin zu *E. coli*, auch wenn den Proteinen

bislang nicht immer eine Funktion zugeordnet werden konnte. Tatsächlich ist in jedem sequenzierten Genom eines anaeroben oder fakultativ anaeroben Bakteriums wenigstens ein zu *hadI* homologes Gen zu finden.

5.3 Die Dehydratase der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase

5.3.1 Reinigung und biochemische Charakterisierung

Zwar besitzt die Dehydratase am C-terminalen Ende der β -Untereinheit ein *Strep-tag* II-Peptid, doch bindet das Protein kaum an eine *Strep*-Tactin-Säule (Kim *et al.*, 2005), so dass Affinitätschromatographie nicht zur Reinigung verwendet werden konnte. Deshalb erfolgte die Reinigung mittels dreier Chromatographieschritte mit einer Ausbeute von durchschnittlich 2,5 mg pro Gramm Nasszellgewicht. Die biochemische Charakterisierung ist in Übereinstimmung mit den von Kim *et al.* publizierten Daten (Kim *et al.*, 2005). In Lösung liegt die Dehydratase als Heterodimer vor, bestehend aus der α -Untereinheit HadB und der β -Untereinheit HadC. Das UV/Vis-Absorptionsspektrum weist die charakteristischen Merkmale von Proteinen auf, die mindestens ein [4Fe-4S]-Zentrum enthalten (Lippard & Berg, 1995). Die Werte der spezifischen Aktivität variierten je nach Reinigung zwischen 3 und 25 U/mg, liegen aber dennoch unter den publizierten Werten von 110-150 U/mg (Kim *et al.*, 2005). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass nicht 100 % der Dehydratase [4Fe-4S]-Zentren enthielten und das Enzym folglich nicht vollständig aktiv war. Zwar führte die Rekonstitution zu einer Verbesserung des Verhältnisses von A_{410} zu A_{280} , doch wurde die spezifische Aktivität hiervon nicht beeinflusst. Dies kann bedeuten, dass die Dehydratase nach wie vor nicht vollständig mit Fe/S-Zentren besetzt war, da sich Fe/S-Zentren bei der Rekonstitution nur auf der Oberfläche angelagert haben. Alternativ ist denkbar, dass die Dehydratase zwar zu 100 % Fe/S-Zentren enthielt (was durch den Besetzungsgrad in der Struktur gestützt wird), jedoch generell weniger aktiv war. Die Abweichungen im Verhältnis von A_{410} zu A_{280} bei verschiedenen Reinigungen kann in diesem Fall durch unterschiedliche Reinheitsgrade des Enzyms erklärt werden.

5.3.2 Reduktion der Dehydratase

Aufgrund des negativen Redoxpotenzials kann die Dehydratase nicht durch chemische Reduktionsmittel wie Natriumdithionit oder Titan(III)citrat reduziert werden (Kim *et al.*, 2005). Die Reduktion erfolgt *in vivo* durch den Aktivator und kann auch *in vitro* mit Hilfe des Aktivators durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 4.3.3). Die benötigte Energie stammt aus der Hydrolyse von ATP. Es wurde gezeigt, dass auch die Methode der Photoreduktion dazu verwendet werden kann, ein Elektron auf die Dehydratase zu übertragen (vgl. Abschnitt 4.3.3). Die Spektren bei der Reduktion mit dem Aktivator werden durch Natriumdithionit und eventuell oxidiertes DTT im Wellenlängenbereich unterhalb von 350 nm beeinflusst (Cleland, 1964; Mayhew, 1978). Der Anfangswert der Absorption bei 410 nm ist bei der Photoreduktion höher als bei der Reduktion mit dem Aktivator, was auf das Vorhandensein von Deazaflavin in ersterem Reaktionsansatz zurückzuführen sein kann. Dass die Endwerte bei beiden Reduktionsarten dennoch fast gleich sind, kann dadurch erklärt werden, dass bei der Photoreduktion zumindest zum Teil beide Fe/S-Zentren reduziert wurden.

Um die Reversibilität der Photoreduktion zu prüfen sollte eine Reoxidation mittels Thioninacetat oder $K_3Fe(CN)_6$ durchgeführt werden, was jedoch nicht erfolgreich war. Dies kann verschiedene Ursachen haben, wobei generell festzuhalten ist, dass der Elektronentransfer von zahlreichen Faktoren abhängt, die nicht alle direkt vergleichbar und kontrollierbar sind. Eine mögliche Erklärung ist jedoch, dass die Oxidationsmittel aufgrund ihrer Größe und der Begrenztheit des Substratkanals nicht in das aktive Zentrum gelangen konnten. Weiterhin ist denkbar, dass der Elektronentransfer wegen des großen Potenzialunterschieds nicht zustande kam (Markus-invertierter Bereich (Übersichtsartikel in (Marcus & Sutin, 1985))). Zwar beträgt die kürzeste Entfernung der [4Fe-4S]-Zentren zur Oberfläche jeweils nur etwa 11 Å (vgl. Abschnitt 4.3.7), doch ist anzunehmen, dass die Dehydratase Mechanismen entwickelt hat, um den zufälligen Verlust des hoch energetischen Elektrons über die Oberfläche zu unterbinden. Auch bei anderen Enzymen, wie beispielsweise der Nitrogenase, weisen die Fe/S-Zentren nur geringe Entfernungen zur Proteinoberfläche auf (Tezcan *et al.*, 2005). Dennoch wird ein zufälliger Verlust des Elektrons verhindert, wobei der Mechanismus hierfür ungeklärt ist.

Bei Zugabe von (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA zur reduzierten Dehydratase konnte Substratumsatz beobachtet werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Photoreduktion zur Aktivierung der Dehydratase verwendet werden kann. Gleichwohl kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei dieser Art der Reduktion ein Teil der [4Fe-4S]-Zentren zerstört wird.

5.3.3 Die Struktur der Dehydratase

Gesamtstruktur. Jede Untereinheit der heterodimeren Dehydratase kann in drei Domänen aufgeteilt werden. Überlagert man die α - und β -Untereinheit, so ist ersichtlich, dass sie eine nahezu identische Topologie besitzen, obwohl sie eine Sequenzidentität von lediglich 19,7 % aufweisen. Basierend auf chemischer Analyse und Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma wurde bislang angenommen, dass die Dehydratase nur ein [4Fe-4S]-Zentrum pro Heterodimer enthält (Kim *et al.*, 2005). Die Struktur zeigte jedoch, dass jede Untereinheit ein [4Fe-4S]-beinhaltet.

Bei der Durchsuchung der PDB mit DaliLite v.3 (Holm *et al.*, 2008) konnten keine Strukturen gefunden werden, die eine klare Ähnlichkeit zu den Untereinheiten der Dehydratase aufweisen. Dennoch wurden einige Metalloenzyme mit komplexen Fe/S-Zentren identifiziert, die ähnliche Struktur motive besitzen. Hierzu zählen beispielsweise die Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (CODH) (Jeoung & Dobbek, 2007) sowie das MoFe-Protein der Nitrogenase (Kim *et al.*, 1993). Als gemeinsames strukturelles Merkmal weisen diese Enzyme zwei Domänen mit gemischter α/β -Topologie auf, die jeweils ein zentrales, paralleles 4-strängiges β -Faltblatt mit der Reihenfolge 2-1-3-4 enthalten, das auf ein Metallzentrum zeigt (Rees, 2002). Abbildung 5-11 stellt die Überlagerung der β -Untereinheit der Dehydratase mit einem Monomer der CODH II aus *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* dar. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Ähnlichkeit der Strukturen auf die Domänen beschränkt, die die β -Faltblätter enthalten.

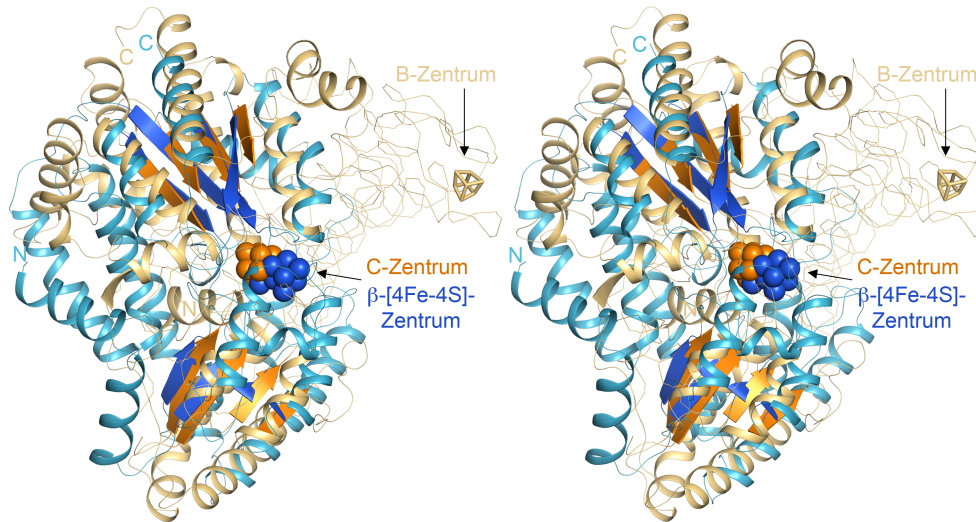


Abbildung 5-11: Stereoabbildung der Überlagerung der β -Untereinheit der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase (blau) und einem Monomer der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase II (CODH II) aus *Carboxydothermus hydrogenoformans* (orange, PDB-Nummer: 3B51). Die Dehydratase ist als Bändermodell dargestellt, wobei das β -[4Fe-4S]-Zentrum als Kugelmodell gezeigt ist. Die N-terminale Domäne der CODH II ist als Schleife gezeigt, die anderen Domänen als Bändermodell. Das C-Zentrum ist als Kugelmodell und das B-Zentrum als Stäbchenmodell dargestellt. Die Überlagerung basiert auf C α -Atomen. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Die Fe/S-Zentren. Jedes der [4Fe-4S]-Zentren wird von drei Cysteinresten koordiniert. Das α -[4Fe-4S]-Zentrum besitzt als vierten Liganden ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxidion. Diese Art der Koordination eines [4Fe-4S]-Zentrums ist ähnlich zu der, die im aktiven Zentrum der Aconitase gefunden wurde (Beinert *et al.*, 1996). Der terminale Ligand des β -[4Fe-4S]-Zentrums wurde als SH-Gruppe modelliert. Die Koordination eines [4Fe-4S]-Zentrums durch drei Cysteinreste und eine Sulfhydrylgruppe wurde in einem biologischen System bislang noch nicht beschrieben, wobei der SH-Gruppe keine spezifische Funktion zugeordnet werden konnte.

Die kürzeste Distanz zwischen den Ecken der beiden Fe/S-Zentren beträgt 12 Å und liegt somit in einem Bereich, der einen einfachen Elektronentransfer zwischen den Zentren erlaubt (Page *et al.*, 1999). Dass eine Reduktion der Zentren mittels konventioneller Reduktionsmittel nicht möglich war (Kim *et al.*, 2005), sondern nur durch den Aktivator bzw. durch Photoreduktion erreicht werden konnte (vgl. Abschnitt 4.3.3), deutet darauf hin, dass das Potenzial für das [4Fe-4S]^{2+/+}- Redoxpaar bei beiden Fe/S-Zentren sehr tief ist (< -600 mV). Dies ist über die Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungsinteraktionen des jeweiligen Fe/S-Zentrums zu erklären. In der Struktur wurde sowohl bei dem α - als auch dem β -[4Fe-4S]-Zentrum nur ein Wasserstoffbrückenbindungsdonor gefunden, nämlich ein

Wassermolekül, das sich auf der dem besonderen Eisenatom gegenüberliegenden Seite in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu einem Schwefelatom des [4Fe-4S]-Zentrums befindet (Abbildung 4-22). Das Vorhandensein von Wasserstoffbrückenbindungen zu den verbrückenden Sulfidoliganden und Cysteinthiolatliganden erhöht das Redoxpotenzial eines [4Fe-4S]-Zentrums, da der reduzierte Zustand ($[4Fe-4S]^+$) stabilisiert wird (Dey *et al.*, 2007). Folglich führt eine niedrige Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungsinteraktionen zu einem negativen Redoxpotenzial. In der Dehydratase besitzt jedes der [4Fe-4S]-Zentren nur einen Wasserstoffbrückenbindungsdonor, was das negative Redoxpotenzial erklärt.

Bei der Aktivierung der Dehydratase wird ein Elektron von dem exponierten, reduzierten [4Fe-4S]-Zentrum des Aktivators auf die Dehydratase übertragen. Da der kürzeste Abstand der beiden Fe/S-Zentren der Dehydratase zur Oberfläche des Proteins jeweils in etwa 11 Å beträgt, ist es strukturell möglich, dass das Elektron entweder auf das α - oder das β -[4Fe-4S]-Zentrum transferiert wird. Da sich das β -[4Fe-4S]-Zentrum in Elektronentransferdistanz zum α -Zentrum befindet, könnte das katalytisch aktive Elektron, welches das Ketylradikalanion generiert, zwischen den Fe/S-Zentren hin und her wechseln.

Das aktive Zentrum und Substratbindung. (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA bindet im Substratkanal in der α -Untereinheit und koordiniert das besondere Eisenatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung. Folglich befindet sich das aktive Zentrum in der α -Untereinheit am α -[4Fe-4S]-Zentrum. Die Interaktion der Carboxylgruppe von Glu55 mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung ist die einzige direkte Wechselwirkung des 2-Hydroxyisocaproylteils mit umgebenden Aminosäuren. Zwar gibt es einige wenige direkte und indirekte Wechselwirkungen des CoA-Teils mit dem Protein, doch insgesamt ist das Substrat relativ schwach gebunden, was insbesondere für den 2-Hydroxyisocaproylteil konformationellen Freiraum bedeutet. In Abwesenheit von Substrat ist ein Wasserligand an das α -[4Fe-4S]-Zentrum gebunden und es sind drei weitere Wassermoleküle in der direkten Umgebung des Fe/S-Zentrums zu finden. Hierdurch entsteht eine hydrophile Umgebung am α -[4Fe-4S]-Zentrum. Sobald (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA in das aktive Zentrum gelangt, werden die dort vorhandenen Wassermoleküle verdrängt und das Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung ersetzt den terminalen Wasserliganden am α -[4Fe-4S]-Zentrum. Da der 2-Hydroxyisocaproylteil abgesehen von der 2-Hydroxygruppe apolar ist, führt die Substratbindung zu einer Änderung des elektrostatischen Umfeldes des α -[4Fe-4S]-Zentrums. Das α - und das β -[4Fe-4S]-Zentrum befinden sich in Elektronentransferdistanz. Somit könnte das katalytisch aktive

Elektron in Abwesenheit von Substrat am β -Zentrum lokalisiert sein und dort „gespeichert“ werden.

Vergleicht man die Dehydratasestrukturen mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA und (*R*)-2-Hydroxyisocaproat, so ist auffällig, dass die Bindung der Liganden sehr ähnlich ist (Abbildung 5-12).

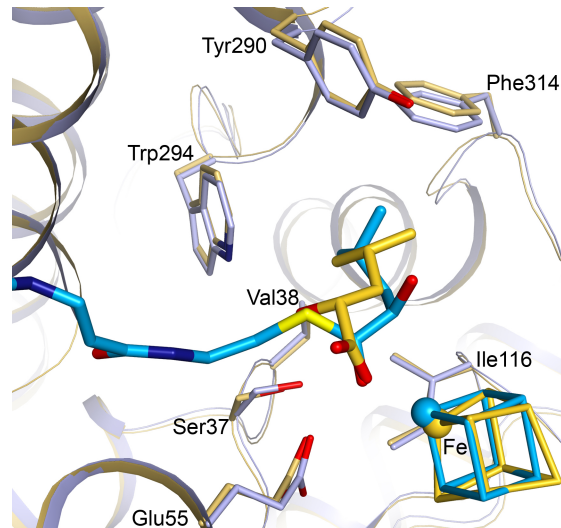


Abbildung 5-12: Vergleich der Bindungsmodi von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA und (*R*)-2-Hydroxyisocaproat. Gezeigt ist die Überlagerung der α -Untereinheiten der Dehydratase mit gebundenem (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA (blau) und (*R*)-2-Hydroxyisocaproat (dunkelgelb). Das Proteinrückgrat ist in der Bänderdarstellung gezeigt, Kofaktoren, Liganden und Aminosäuren im aktiven Zentrum als Stäbchenmodell. Das besondere Eisenatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums ist als Kugel hervorgehoben. In den Aminosäuren und Liganden sind Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau und Schwefelatome gelb gefärbt. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

(*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA koordiniert das besondere Eisenatom des α -Zentrums mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung, (*R*)-2-Hydroxyisocaproat mit einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe. Jedoch unterscheiden sich die Liganden in der Orientierung der 2-Hydroxygruppe, was aber darauf zurückgeführt werden kann, dass das Substrat relativ flexibel gebunden ist, da es kaum direkte Wechselwirkungen mit Protein gibt. Weiterhin führt die Bindung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproat zu keinen konformationellen Änderungen, im Vergleich zur substratfreien Dehydratase. Zwar wurde die Dehydratase nicht mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA kokristallisiert, sondern durch *soaking* mit Substrat versetzt, doch zeigt die Überlagerung mit der (*R*)-2-Hydroxyisocaproat-gebundenen Dehydratase, dass in den aktiven Zentren keine strukturellen Unterschiede zu sehen sind. Somit kann gefolgert werden, dass die Bindung des Substrates wahrscheinlich nicht zu Konformationsänderungen führt.

5.3.4 Struktureller Vergleich der Dehydratase mit Aconitase und SAM-Radikalenzymen

In Abwesenheit von Substrat ist ein Hydroxidion oder ein Wassermolekül als terminaler Ligand an das besondere Eisensatom des α -[4Fe-4S]-Zentrums gebunden (vgl. Abschnitt 4.3.7). Ist (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA gebunden, so ersetzt dieses den OH_x -Liganden. Die Tatsache, dass das Substrat oder ein Cofaktor an die offene Koordinationsstelle eines [4Fe-4S]-Zentrums bindet, das von drei Cysteinresten koordiniert ist, wurde auch bei der Aconitase (Beinert *et al.*, 1996) und SAM-Radikalenzymen (Berkovitch *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2008) beobachtet, jedoch unterscheiden sich die Bindungsmodi (Abbildung 5-13).

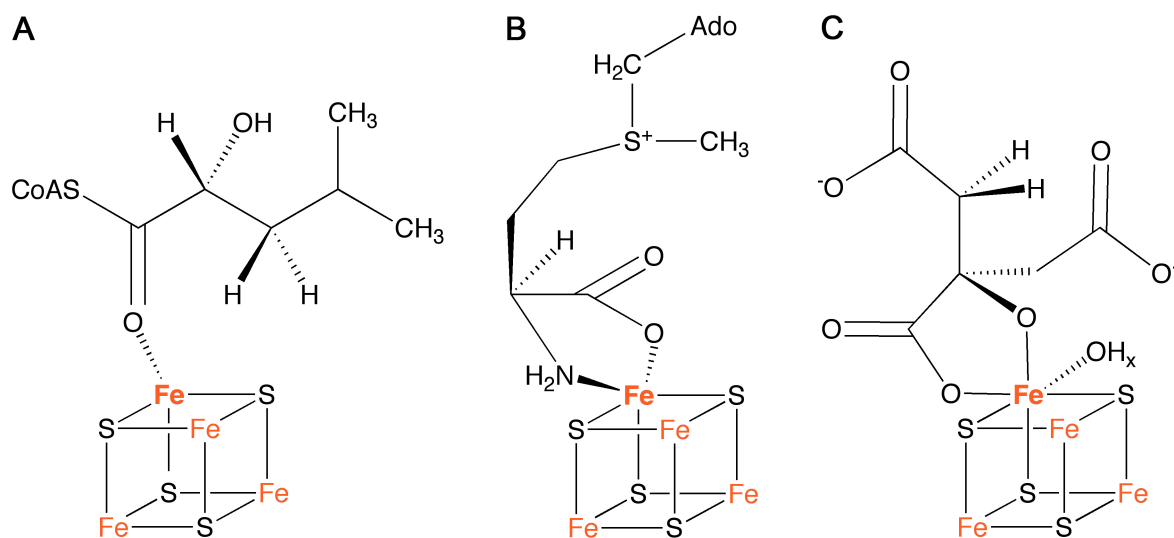


Abbildung 5-13: Schematische Darstellung der Koordination des besonderen Eisensatoms eines [4Fe-4S]-Zentrums in verschiedenen Enzymen. Gezeigt sind die Koordinationsmodi des besonderen Eisensatoms eines [4Fe-4S]-Zentrums in (A) der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase, (B) der Lysin-2,3-Aminomutase und (C) der Aconitase. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Während bei der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase das Fe/S-Zentrum einzähnig durch das Substrat koordiniert wird, findet sich bei SAM-Radikalenzymen und Aconitase eine zweizähnige Koordination durch den Cofaktor/das Substrat. Bei der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase koordiniert das Substrat das α -Zentrum indem das Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung an das besondere Eisenatom bindet, woraus sich eine verzerrt tetraedrische Koordination ergibt. Hingegen koordiniert in SAM-Radikalenzymen der Cofaktor SAM, aus dem das katalytisch aktive Radikal gebildet wird, das besondere Eisenatom mit der COO^- - und der NH_2 -Gruppe, was zu einer fünfzähligen Koordination führt. Hierbei ist SAM teilweise um das Fe/S-Zentrum gewunden. Bei der Aconitase schließlich wird das Fe/S-Zentrum durch zwei funktionelle Gruppen des Substrates

(Citrat) koordiniert. Zusätzlich bindet ein Wasserligand an das besondere Eisenatom, so dass sich insgesamt eine oktaedrische Koordination ergibt.

Wie bei der Dehydratase wurde auch bei der Aconitase beobachtet, dass in Abwesenheit von Substrat ein Solvensmolekül (OH_x) als terminaler Ligand am besonderen Eisenatom fungiert (Werst *et al.*, 1990). ^1H - und ^2H -Elektron-Kern-Doppelresonanz (ENDOR)-Experimente legen nahe, dass es sich bei dem Liganden um ein Hydroxidion handelt, das nach Substratbindung protoniert wird.

In SAM-Radikalenzymen wird das $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum, das von nur drei Cysteinen koordiniert ist, dazu verwendet, reduktiv ein Radikal zu generieren (Frey *et al.*, 2008). Weiterhin wird angenommen, dass das besondere Eisenatom dazu dient, ein Elektron mittels *inner-sphere*-Mechanismus in ein geeignetes Molekülorbital in der Nähe zu übertragen (Nicolet *et al.*, 2009). Bei der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase führt die Interaktion des Substrates mit dem α -Zentrum dazu, dass das Elektronen-aufnehmende, antibindende π^* -Orbital der Thioestercarbonylgruppe von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA in unmittelbare Nähe zu dem besonderen Eisenatom gebracht wird. Dies ist für einen kontrollierten *inner-sphere*-Elektronentransfer zur Erzeugung des Ketylradikalanions notwendig. Folglich dient das α - $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum der Übertragung des hoch energetischen Elektrons auf das Substrat und somit zur Erzeugung des Ketylradikalanions.

5.3.5 Strukturbasierter Reaktionsmechanismus zur Bildung von Ketylradikalen

Der Reaktionsmechanismus der Dehydratisierung (Abbildung 5-14) basiert auf den strukturellen Daten der Dehydratase (vgl. Abschnitte 4.3.7, 5.3.3 und 5.3.4) und dem vorgeschlagenen Aktivierungsmechanismus (vgl. Abschnitt 5.2.7). Im inaktiven Zustand sind die beiden $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentren der Dehydratase oxidiert ($[\text{4Fe-4S}]^{2+}$) und ein Hydroxyligand ist an das besondere Eisenatom des α - $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrums gebunden. Während des Aktivierungsprozesses bindet der reduzierte Aktivator mit gebundenem ATP an die Dehydratase und die beiden bilden einen Aktivierungskomplex (vgl. Abschnitt 4.3.4 und (Kim *et al.*, 2010)). Ein Elektron wird von dem reduzierten $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum des Aktivators auf das β - $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum der Dehydratase übertragen, für das zu diesem Zeitpunkt ein positiveres Redoxpotenzial postuliert wird als für das α - $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum, und wird dort gespeichert.

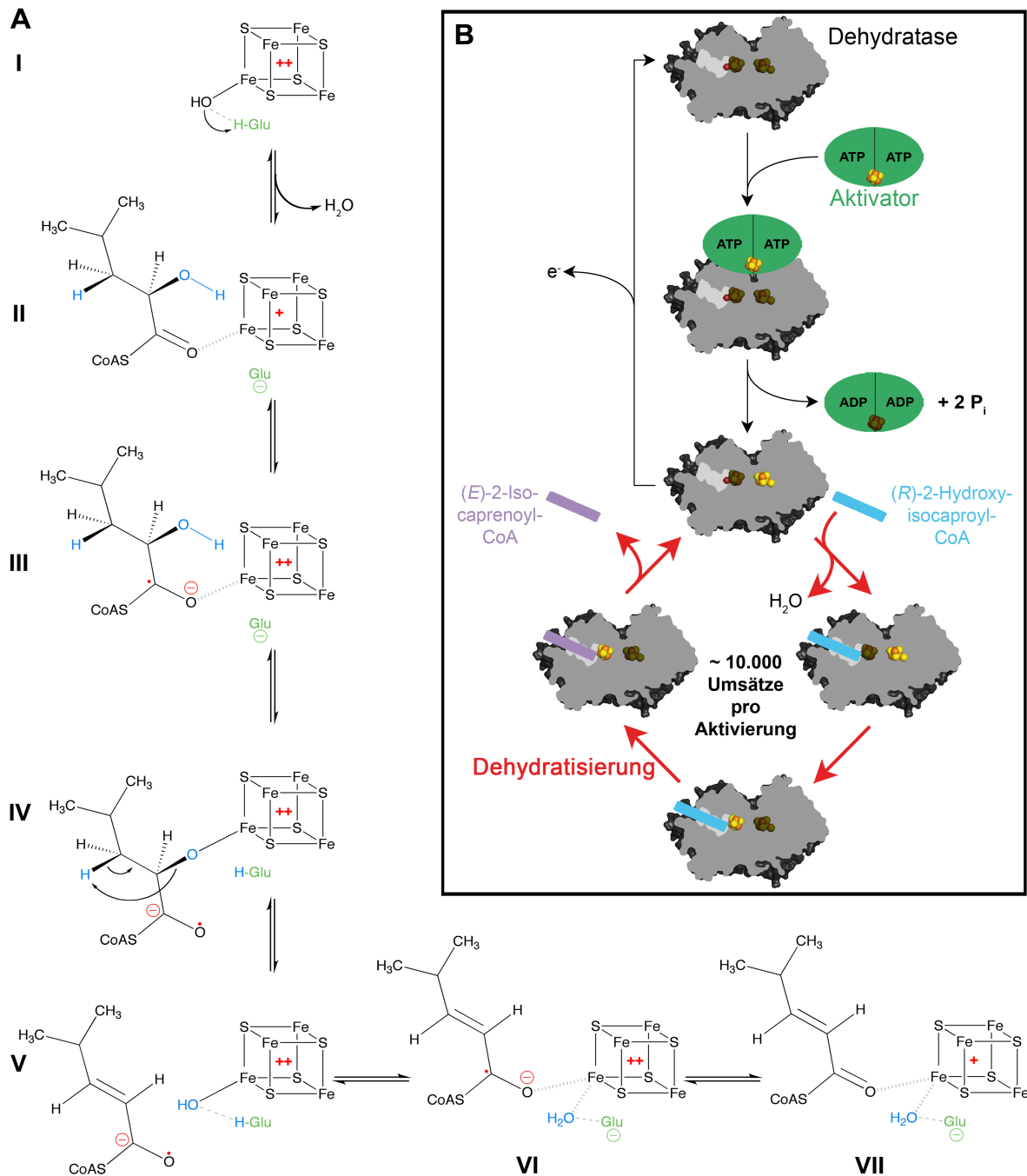


Abbildung 5-14: Strukturbasierter Reaktionsmechanismus. (A) Schemata von sieben Zuständen des α -[4Fe-4S]-Zentrums, die während der Dehydratisierung auftreten. Unterbrochene Linien deuten Wasserstoffbrückenbindungen an, kurze graue Linien zeigen koordinative Bindungen. (I) Oxidiertes α -[4Fe-4S]-Zentrum mit Hydroxygruppe als terminalem Liganden. (II) Das Substrat ersetzt das koordinierende Wassermolekül am besonderen Eisenatom, wodurch das Redoxpotenzial des α -[4Fe-4S]-Zentrums steigt, so dass das hoch energetische Elektron vom β -[4Fe-4S]-Zentrum zum α -[4Fe-4S]-Zentrum transferiert wird. (III) *Inner-sphere*-Elektronentransfer vom α -[4Fe-4S]-Zentrum auf das Carbonylkohlenstoffatom der Thioesterbindung. (IV) Koordinationswechsel des Substrat-verwandten Ketylradikals. (V) Die 2-Hydroxygruppe wurde abgespalten und das β -Wasserstoffatom wurde als Proton aus dem resultierenden Enoxyradikal mit der Alkoxidgruppe am α -[4Fe-4S]-Zentrum als Base eliminiert. (VI) Das Produkt-verwandte Ketylradikal und das eliminierte Wassermolekül sind am α -[4Fe-

4S]-Zentrum gebunden. (VII) Das Elektron wird wieder auf das α -[4Fe-4S]-Zentrum übertragen und das Produkt Isocaprenoyl-CoA ist am α -[4Fe-4S]-Zentrum gebunden. Das Produkt verlässt das aktive Zentrum und der Wasserligand wird von Glu55 deprotoniert, so dass das Elektron auf das β -[4Fe-4S]-Zentrum übertragen wird. **(B)** Transfer und Regenerierung des Elektrons. Reduzierte [4Fe-4S]-Zentren sind in hellen Farben gezeigt, oxidierte [4Fe-4S]-Zentren in dunklen Farben. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

ATP-Hydrolyse dient hierbei als Triebkraft für den Elektronentransfer. Das Redoxpotenzial der Dehydratase (< -600 mV) ist deutlich negativer als das des Aktivators (vgl. Abschnitte 4.3.3 und 5.3.2 und (Kim *et al.*, 2005)), so dass das übertragene Elektron hoch energetisch ist. Glu55 kann nun ein Proton auf den Hydroxyliganden am α -[4Fe-4S]-Zentrum übertragen, zu dem es sich in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz befindet. Das gebildete Wassermolekül wird durch die Bindung von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA am α -[4Fe-4S]-Zentrum mittels des Carbonylsauerstoffatoms der Thioesterbindung verdrängt, ebenso wie die Wassermoleküle im aktiven Zentrum. Dies hat eine Änderung der elektrostatischen Umgebung des α -[4Fe-4S]-Zentrums zur Folge, wodurch dessen Redoxpotenzial erhöht und somit ein Elektronentransfer vom β - zum α -[4Fe-4S]-Zentrum favorisiert wird. Im nächsten Schritt wird das Elektron auf das Substrat übertragen, wobei die am α -[4Fe-4S]-Zentrum gebundene Carbonylgruppe reduziert und folglich das Substrat-verwandte Ketylradikalanion gebildet wird (Kim *et al.*, 2008).

Wir schlagen vor, dass die Bildung des Ketylradikals als Triebkraft für eine Änderung der Koordination des α -[4Fe-4S]-Zentrums wirkt, die notwendig für die Abspaltung der 2-Hydroxygruppe ist. Die Ligandensubstitution besteht darin, dass das Substrat-Ketylradikal das α -[4Fe-4S]-Zentrum nicht mehr mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung koordiniert, sondern mit der 2-Hydroxygruppe. Diese Koordinationsänderung kann durch die Rotation des 2-Hydroxyisocaproylteils um die σ -Bindungen des β -Mercaptoethylaminteils in Nachbarschaft der Thioestergruppe sowie kleinen strukturellen Anpassungen erreicht werden (Abbildung 5-15). Da die Substratbindetasche ausreichend Platz bietet und der 2-Hydroxyisocaproylteil abgesehen von der Interaktion mit dem α -[4Fe-4S]-Zentrum und Glu55 keine weiteren direkten Wechselwirkungen mit dem Protein aufweist, ist die Substitution ohne Konformationsänderungen seitens des Proteins möglich. Die Koordinationsänderung führt jedoch dazu, dass die Carboxylatgruppe von Glu55 etwas rotiert und sich nun in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu dem Sauerstoffatom der 2-Hydroxygruppe und dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung befindet.

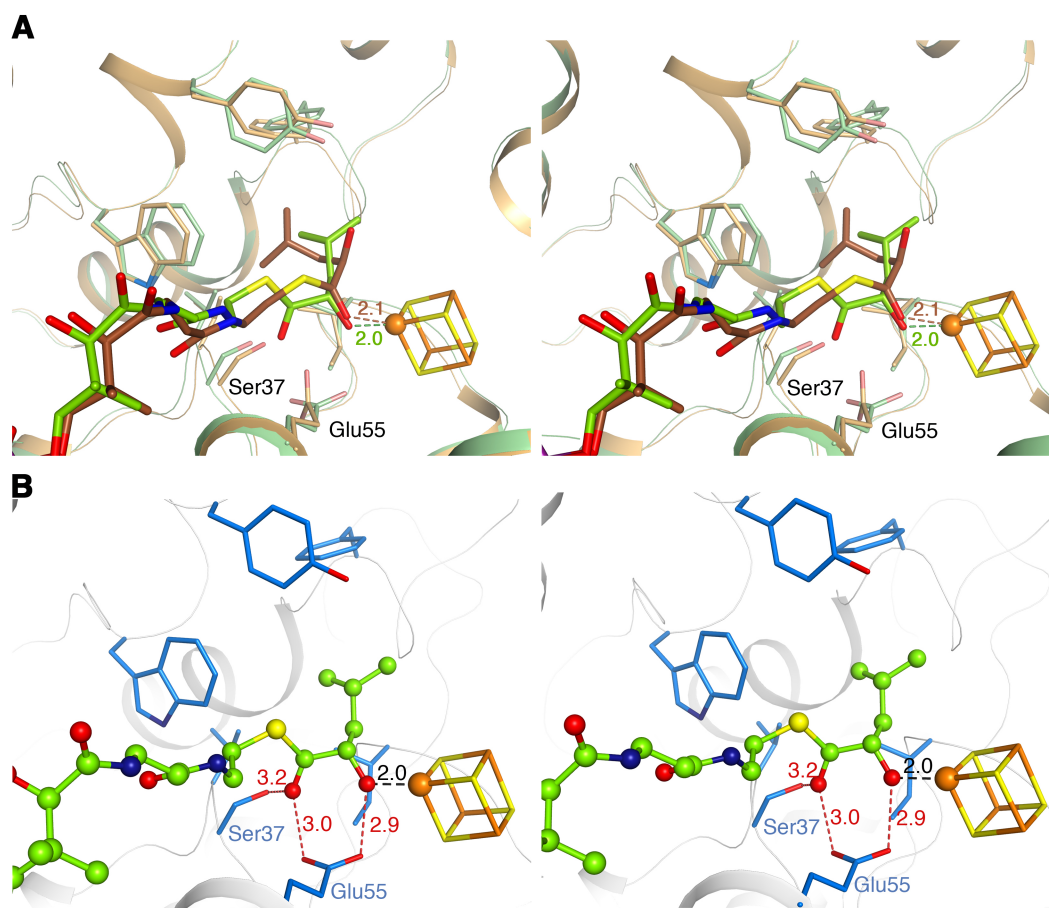


Abbildung 5-15: Modellierung des Koordinationswechsels von (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA während der Katalyse. (A) Stereoabbildung der Überlagerung der aktiven Zentren der Dehydratase mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA, welches das besondere Eisenatome des α -Zentrums mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioestergruppe (braun) oder mit der 2-Hydroxygruppe (grün) koordiniert. Das Proteinrückgrat ist als Bändermodell gezeigt, das Substrat sowie einige Aminosäuren und das [4Fe-4S]-Zentrum als Stäbchenmodell. Das besondere Eisenatom ist als Kugel hervorgehoben. Kohlenstoffatome sind entsprechend der Farbe des Koordinationsmodus gefärbt, Eisenatome orange, Schwefelatome gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome dunkelblau. Die durchbrochenen Linien deuten koordinative Bindungen an, wobei Distanzen in Ångström angegeben sind. **(B)** Stereoabbildung des aktiven Zentrums mit (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA, das das besondere Eisenatom mit der 2-Hydroxygruppe koordiniert. Die Darstellung ist grundsätzlich wie in (A), wobei das Substrat als Kugel- und Stäbchenmodell gezeigt ist. Ausgewählte Aminosäuren sind als blaue Stäbchen dargestellt. Durchbrochene Linien deuten koordinative Bindungen (schwarz) und Wasserstoffbrückenbindungen (rot) an. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Weiterhin stimmt die Konformation der Isopropylgruppe in der modellierten Struktur fast mit einem der beiden Konformere des Produkt-Ketylradikals überein, die basierend auf der Winkelabhängigkeit der Hyperfeinkopplung in den ESR-Spektren des ^1H -Atoms am C4-Atom bestimmt wurden (Kim *et al.*, 2008). Aus chemischer Sicht ist die Koordinationsänderung notwendig, da hierdurch die Lokalisierung der negativen Ladung am Carbonylkohlenstoffatom favorisiert und folglich dessen Nukleophilie erhöht wird. Dies

wiederum ermöglicht die Abspaltung der 2-Hydroxygruppe. Ohne Koordinationswechsel des Substrat-verwandten Ketylradikals würde die negative Ladung am Sauerstoffatom der Ketylgruppe stabilisiert werden und die Eliminierung der 2-Hydroxygruppe könnte nicht erfolgen. Von der Aconitase ist bereits bekannt, dass während der Katalyse das Substrat ebenfalls die Koordination am [4Fe-4S]-Zentrum ändert (Beinert *et al.*, 1996). In diesem Fall findet jedoch nicht nur eine kleine Umlagerung statt, sondern eine vollständige Umorientierung des Liganden. Nach der Dehydratisierung von Citrat dreht sich das entstandene *cis*-Aconitat um 180 °, so dass es vom Citrat-Modus in den Isocitrat-Modus wechselt.

Nach erfolgter Koordinationsänderung des Substrat-verwandten Ketylradikalanions wird die 2-Hydroxygruppe abgespalten und bleibt als Alkoxidgruppe an das besondere Eisenatom gebunden. In dem resultierenden Enoxyradikal ist die Azidität des β -Wasserstoffatoms um circa 26 pK-Einheiten erhöht (Smith *et al.*, 2003), so dass es als Proton eliminiert werden kann. In unmittelbarer Umgebung befindet sich jedoch keine Aminosäure, die als Base dienen kann. Somit ist die einzig möglich Base für die Abspaltung des Protons die Alkoxidgruppe am α -[4Fe-4S]-Zentrum. Dies erklärt die *syn*-Eliminierungen, die experimentell bei der (*R*)-Lactyl-Dehydratase (Hofmeister & Buckel, 1992), (*R*)-3-Phenyllactyl-Dehydratase (Pitsch & Simon, 1982) und (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase (Buckel, 1980) beobachtet wurden. Das resultierende Produkt-verwandte Ketylradikalanion wurde von Kim *et al.* mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen (Kim *et al.*, 2008). Es koordiniert das α -[4Fe-4S]-Zentrum wieder mit dem Carbonylsauerstoffatom der Thioesterbindung und überträgt das katalytische Elektron wieder zurück auf das α -[4Fe-4S]-Zentrum während des abgespaltenen Wassermolekül am Fe/S-Zentrum gebunden bleibt. Schließlich verlässt das Produkt das aktive Zentrum, woraufhin das Elektron zum β -[4Fe-4S]-Zentrum wechselt, wo es gespeichert wird bis erneut Substrat am α -[4Fe-4S]-Zentrum bindet. Auf diese Weise wird das hoch energetische Elektron regeneriert und zahlreiche Umsätze sind möglich bevor eine erneute Aktivierung notwendig ist.

Der Wechsel des Elektrons zwischen dem α - und β -[4Fe-4S]-Zentrum gewährleistet, dass sich das Elektron nur am α -[4Fe-4S]-Zentrum befindet, wenn Substrat gebunden ist. Hierdurch wird das Risiko minimiert, das hoch energetische Elektron in ungewollten Nebenreaktionen mit kleinen oxidierten Molekülen zu verlieren, die unter physiologischen Bedingungen zufällig in den Substratkanal gelangen können. Somit schützt der Wechsel des Elektrons das Radikal und ermöglicht der Dehydratase bis zu 10.000 Umsätze bevor eine

neue Aktivierung erfolgen muss (Kim *et al.*, 2005). Die Zahl der Umsätze pro Aktivierung sollte möglichst hoch sein, da pro Aktivierung zwei Mol ATP hydrolysiert werden und nur -146 kJ pro Fermentation von drei Mol L-Leucin gewonnen werden (Herrmann *et al.*, 2008), was in etwa 1,75 Mol ATP entspricht.

Triebkraft für den Elektronentransfer zwischen den Fe/S-Zentren ist wahrscheinlich die Änderung des Redoxpotenzials des α -[4Fe-4S]-Zentrums. Diese beruht auf Änderungen der Umgebung des Fe/S-Zentrums nach Substratbindung bzw. Produktausstoß.

Radikalenzyme haben verschiedene Strategien entwickelt, wie hoch reaktive Intermediate während der Katalyse geschützt und kontrolliert werden können. Ein Beispiel ist das SAM-abhängige Radikalenzym Lysin-2,3-Aminomutase (Lees *et al.*, 2006). Hier wird durch enge van-der-Waals-Kontakte der Transfer von Wasserstoffatomen zwischen Radikalen und ihren Reaktionspartnern erzwungen. Gleichzeitig werden Nebenreaktionen der reaktiven Partner unterbunden. In dem vorgeschlagenen Mechanismus der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase hingegen werden zwei [4Fe-4S]-Zentren dazu verwendet, den Verlust des Radikals während der Katalyse durch Nebenreaktionen zu verhindern und sowohl die Erzeugung als auch die Speicherung des hoch energetischen Elektrons zu kontrollieren.

5.3.6 Die (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase als Modellsystem für phylogenetisch verwandte Enzyme

Die Benzoyl-CoA-Reduktasen sind phylogenetisch mit den (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen verwandt. Sie katalysieren die ATP-abhängige Bildung von Cyclohexadienylcarboxyl-CoA aus Benzoyl-CoA in zwei Ein-Elektronen-Übertragungsschritten (Boll *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Diese Systeme bestehen aus vier verschiedenen Untereinheiten. Zwei dieser Untereinheiten sind mit dem Aktivator verwandt und teilen sich ein [4Fe-4S]-Zentrum. Die anderen beiden sind zu der Dehydratase-Komponente homolog und jede der Untereinheiten enthält ein [4Fe-4S]-Zentrum (Boll *et al.*, 2002). Beide Enzymfamilien generieren während der Katalyse reduktiv Radikale.

Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der (*R*)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen und Benzoyl-CoA-Reduktasen zeigt, dass alle Cysteine, die in der (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase Fe/S-Zentren koordinieren, in den zwei Enzymfamilien konserviert sind (Abbildung 5-16).

116

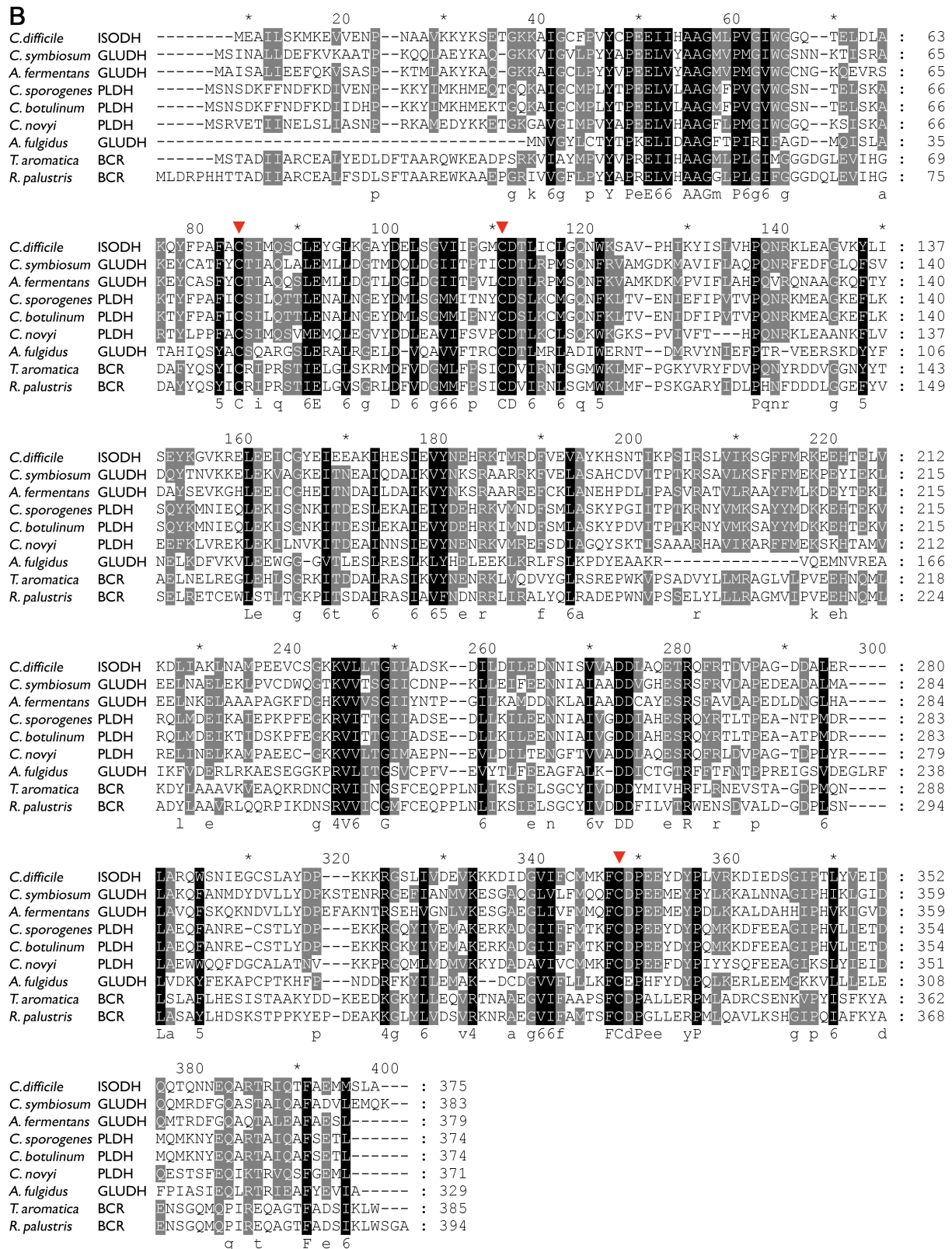


Abbildung 5-16: Aminosäuresequenzvergleich der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen und Benzoyl-CoA-Reduktasen. Gezeigt sind die Alignments der (A) α -Untereinheiten und (B) β -Untereinheiten. Hoch konservierte Aminosäuren sind schwarz markiert, zu 70 % konservierte Aminosäuren grau. Rote Dreiecke zeigen die Cysteine, die [4Fe-4S]-Zentren koordinieren. Das blaue Dreieck markiert die Position des Glutamats, das sich bei der ISODH in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu dem Hydroxyliganden befindet (Glu55). Das grüne Dreieck zeigt die Position des Serins,

das bei der ISODH in Wasserstoffbrückenbindungsdistanz zu Glu55 lokalisiert ist. ISODH: (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase, GLUDH: (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase, PLDH: Phenyllactat-Dehydratase, BCR: Benzoyl-CoA-Reduktase. Verändert nach (Knauer *et al.*, 2011).

Auch das Glutamat im aktiven Zentrum, das in dem vorgeschlagenen Mechanismus essentiell für die Katalyse ist, ist zu 100 % konserviert (Glu55 in der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase). In der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase ist Ser37 für die Positionierung der Seitenkette von Glu55 zuständig. Dieses ist in den (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen vollständig konserviert. Somit kann angenommen werden, dass die Struktur der (R)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase ein strukturelles Modell für die Familien der 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen und Benzoyl-CoA-Reduktasen ist

6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ACP	Acyl-Träger-Protein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat
<i>A. fermentans</i>	<i>Acidaminococcus fermentans</i>
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AHT	Anhydrotetracyclin
Aktivator ^{ox, ADP}	oxidierter Aktivator mit gebundenem ADP
Aktivator ^{red, ADP}	reduzierter Aktivator mit gebundenem ADP
Aktivator ^{red, ADPNP}	reduzierter Aktivator mit gebundenem ADPNP
Aktivator ^{red, Nf}	Nukleotidfreie Form des reduzierten Aktivators
AMPPCP	Adenosin-5'-(β,γ -methylen)-triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARP	Actin-verwandtes Protein (<i>actin related protein</i>)
ASKHA-Familie	Familie der Acetat- und Zuckerkinasen, Hsc70 und Actin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
BCR	Benzoyl-CoA-Reduktase
BSA	Rinderserumalbumin
CaiB	(<i>R</i>)-Carnitin-CoA-Transferase
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. novyi</i>	<i>Clostridium novyi</i>
CoA	Coenzym A
<i>C. propionicum</i>	<i>Clostridium propionicum</i>
<i>C. saccharolyticum</i>	<i>Clostridium saccharolyticum</i>
<i>C. sporogenes</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>C. symbiosum</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMF	Dimethylformamid
DTB	D-Desthiobiotin
DTT	Dithiothreitol

<i>E. albertii</i>	<i>Escherichia albertii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOR-Spektroskopie	Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie
ESR-Spektroskopie	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
<i>E. yurii</i>	<i>Eubacterium yurii</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fe	Eisen
Fe-Protein	Eisenprotein der Nitrogenase
Frc	Formyl-CoA:Oxalat-CoA-Transferase
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
GLUDH	(<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase
G-Proteine	Guaninnukleotidbindungsproteine
<i>hadA</i>	Gen der (<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase aus <i>Clostridium difficile</i>
HadA	(<i>E</i>)-2-Isocaprenoyl-CoA:2-Hydroxyisocaproat-CoA-Transferase aus <i>Clostridium difficile</i>
<i>hadBC</i>	Gen der Dehydratase der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus <i>Clostridium difficile</i>
HadBC	Dehydratase der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase aus <i>Clostridium difficile</i>
<i>hadI</i>	Gen des Aktivators der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydrtase aus <i>Clostridium difficile</i>
HadI	Aktivator der (<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydrtase aus <i>Clostridium difficile</i>
HgdC _{AF}	Aktivator der (<i>R</i>)-2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
ISODH	(<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase
LB	Luria-Bertani
MAD	<i>multiple wavelength anomalous dispersion</i>
MoFe-Protein	Molybdän-Eisen-Protein der Nitrogenase
<i>M. genomosp</i>	<i>Megasphaera genomospecies</i>

MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<i>M. barkeri</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglycol
PISA-Server	<i>protein interfaces, surfaces and assemblies service</i> -Server
PLDH	Phenyllactatdehydratase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
<i>r.m.s.</i>	<i>root mean square</i>
<i>R. palustris</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std ^{MOPS} -Medium	gepuffertes Standard I-Medium
SV	Säulenvolumen
<i>T. aromatica</i>	<i>Thauera aromatica</i>
TB-Medium	<i>terrific broth</i> -Medium
TB ^{Glc} -Medium	TB-Medium mit Glucose
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLS	<i>translation/libration/screw</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/Vis-Spektroskopie	Spektroskopie im ultraviolett und sichtbaren Bereich
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

7 Referenzen

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213-221.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Anderson, C. M., McDonald, R. C., and Steitz, T. A.** (1978) Sequencing a protein by x-ray crystallography. I. Interpretation of yeast hexokinase B at 2.5 Å resolution by model building, *J Mol Biol* **123**: 1-13.
- Anderson, C. M., Stenkamp, R. E., and Steitz, T. A.** (1978) Sequencing a protein by x-ray crystallography. II. Refinement of yeast hexokinase B coordinates and sequence at 2.1 Å resolution, *J Mol Biol* **123**: 15-33.
- Bader, J., Rauschenbach, P., and Simon, H.** (1982) On a hitherto unknown fermentation path of several amino acids by proteolytic clostridia, *FEBS Lett* **140**: 67-72.
- Baetz, A. L., and Allison, M. J.** (1990) Purification and characterization of formyl-coenzyme A transferase from *Oxalobacter formigenes*, *J Bacteriol* **172**: 3537-3540.
- Baker, J. J., and Stadtman, T. C.** (1982) Aminomutases, in *B12: Biochemistry and medicine* (Dolphin, D., Ed.) Wiley-Interscience, New York.
- Banerjee, R., and Vlasie, M.** (2002) Controlling the reactivity of radical intermediates by coenzyme B₁₂-dependent methylmalonyl-CoA mutase, *Biochem Soc Trans* **30**: 621-624.
- Baraniak, J., Moss, M. L., and Frey, P. A.** (1989) Lysine 2,3-aminomutase. Support for a mechanism of hydrogen transfer involving S-adenosylmethionine, *J Biol Chem* **264**: 1357-1360.
- Barker, H. A.** (1961) Fermentations of nitrogenous organic compounds, in *The Bacteria* (Gunsalus, I. C., and R.Y., S., Eds.) 151-207, Academic Press, New York.
- Barker, H. A., Jeng, I. M., Neff, N., Robertson, J. M., Tam, F. K., and Hosaka, S.** (1978) Butyryl-CoA:acetoacetate CoA-transferase from a lysine-fermenting *Clostridium*, *J Biol Chem* **253**: 1219-1225.
- Beinert, H., Kennedy, M. C., and Stout, C. D.** (1996) Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein, *Chem Rev* **96**: 2335-2374.
- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jarrett, J. T., and Drennan, C. L.** (2004) Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme, *Science* **303**: 76-79.

- Boehr, D. D., and Wright, P. E.** (2008) Biochemistry. How do proteins interact?, *Science* **320**: 1429-1430.
- Boll, M., Fuchs, G., and Heider, J.** (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons, *Curr Opin Chem Biol* **6**: 604-611.
- Bork, P., Sander, C., and Valencia, A.** (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7290-7294.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Britz, M. L., and Wilkinson, R. G.** (1982) Leucine dissimilation to isovaleric and isocaproic acids by cell suspensions of amino acid fermenting anaerobes: the Stickland reaction revisited, *Can J Microbiol* **28**: 291-300.
- Brückner, R.** (2003) *Reaktionsmechanismen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L.** (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 905-921.
- Buckel, W., Buschmeier, V., and Eggerer, H.** (1971) The action mechanism of citrate lyase from *Klebsiella aerogenes*, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **352**: 1195-1205.
- Buckel, W., and Bobi, A.** (1976) The enzyme complex citramalate lyase from *Clostridium tetanomorphum*, *Eur J Biochem* **64**: 255-262.
- Buckel, W.** (1980) The reversible dehydration of (*R*)-2-hydroxyglutarate to (*E*)-glutaconate, *Eur J Biochem* **106**: 439-447.
- Buckel, W., Dorn, U., and Semmler, R.** (1981) Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*, *Eur J Biochem* **118**: 315-321.
- Buckel, W., and Keese, R.** (1995) One electron redox reactions of CoASH esters in anaerobic bacteria. A mechanistic proposal., *Angew Chem Int Ed Engl* **34**: 1502-1506.
- Buckel, W., and Golding, B. T.** (1998) Radical species in the catalytic pathways of enzymes from anaerobes, *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 523-541.
- Buckel, W.** (2001) Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol* **57**: 263-273.
- Buckel, W., Hetzel, M., and Kim, J.** (2004) ATP-driven electron transfer in enzymatic radical reactions, *Curr Opin Chem Biol* **8**: 462-467.
- Buckel, W., and Golding, B. T.** (2006) Radical enzymes in anaerobes, *Annu Rev Microbiol* **60**: 27-49.

- Buckel, W.** (2009) Radical and electron recycling in catalysis, *Angew Chem Int Ed Engl* **48**: 6779-6787.
- Burgess, B. K., and Löwe, D. J.** (1996) Mechanism of Molybdenum Nitrogenase, *Chem Rev* **96**: 2983-3012.
- Buss, K. A., Cooper, D. R., Ingram-Smith, C., Ferry, J. G., Sanders, D. A., and Hasson, M. S.** (2001) Urkinase: structure of acetate kinase, a member of the ASKHA superfamily of phosphotransferases, *J Bacteriol* **183**: 680-686.
- Cicchillo, R. M., Baker, M. A., Schnitzer, E. J., Newman, E. B., Krebs, C., and Booker, S. J.** (2004) *Escherichia coli* L-serine deaminase requires a [4Fe-4S] cluster in catalysis, *J Biol Chem* **279**: 32418-32425.
- Cleland, W. W.** (1964) Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups, *Biochemistry* **3**: 480-482.
- Corthesy-Theulaz, I. E., Bergonzelli, G. E., Henry, H., Bachmann, D., Schorderet, D. F., Blum, A. L., and Ornston, L. N.** (1997) Cloning and characterization of *Helicobacter pylori* succinyl CoA:acetoacetate CoA-transferase, a novel prokaryotic member of the CoA-transferase family, *J Biol Chem* **272**: 25659-25667.
- Daesch, G., and Mortenson, L. E.** (1968) Sucrose catabolism in *Clostridium pasteurianum* and its relation to N₂ fixation, *J Bacteriol* **96**: 346-351.
- de La Fortelle, E., and Bricogne, G.** (1997) Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for the Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods, *Methods. Enzymol.* **276**: 472-494.
- Dey, A., Jenney, F. E., Jr., Adams, M. W., Babini, E., Takahashi, Y., Fukuyama, K., Hodgson, K. O., Hedman, B., and Solomon, E. I.** (2007) Solvent tuning of electrochemical potentials in the active sites of HiPIP versus ferredoxin, *Science* **318**: 1464-1468.
- Dickert, S., Pierik, A. J., Linder, D., and Buckel, W.** (2000) The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (*R*)-phenyllactate to (*E*)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*, *Eur J Biochem* **267**: 3874-3884.
- Dickert, S., Pierik, A. J., and Buckel, W.** (2002) Molecular characterization of phenyllactate dehydratase and its initiator from *Clostridium sporogenes*, *Mol Microbiol* **44**: 49-60.
- Dimroth, P., and Eggerer, H.** (1975) Isolation of subunits of citrate lyase and characterization of their function in the enzyme complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3458-3462.
- Dutscho, R., Wohlfarth, G., Buckel, P., and Buckel, W.** (1989) Cloning and sequencing of the genes of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*, *Eur J Biochem* **181**: 741-746.
- Elsden, S. R., and Hilton, M. G.** (1978) Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia, *Arch Microbiol* **117**: 165-172.

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., and Cowtan, K.** (2010) Features and Development of Coot, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:
- Fersht, A.** (1999) Structure and Mechanism in Protein Science, 3rd Edition: W.H. Freeman and Company, New York.
- Flaherty, K. M., McKay, D. B., Kabsch, W., and Holmes, K. C.** (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5041-5045.
- Flaherty, K. M., Wilbanks, S. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B.** (1994) Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment, *J Biol Chem* **269**: 12899-12907.
- Frey, P. A.** (2001) The role of radicals in enzymatic processes, *Chem Rec* **1**: 277-289.
- Frey, P. A.** (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis, *Annu Rev Biochem* **70**: 121-148.
- Frey, P. A., and Magnusson, O. T.** (2003) S-Adenosylmethionine: a wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin?, *Chem Rev* **103**: 2129-2148.
- Frey, P. A., Hegeman, A. D., and Ruzicka, F. J.** (2008) The Radical SAM Superfamily, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 63-88.
- Gabdoulline, R. R., and Wade, R. C.** (2002) Biomolecular diffusional association, *Curr Opin Struct Biol* **12**: 204-213.
- Gandour, R. D.** (1981) On the importance of orientation in general base catalysis by carboxylate, *Bioorganic Chemistry* **10**: 169-176.
- Garrrity, G. M., Boone, D. R., and Castenholz, R. W.** (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, 2nd ed., Springer, New York.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A.** (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res* **31**: 3784-3788.
- Gaut, J. R., and Hendershot, L. M.** (1993) Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain, *J Biol Chem* **268**: 7248-7255.
- Georgiadis, M. M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J. J., and Rees, D. C.** (1992) Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*, *Science* **257**: 1653-1659.
- Glusker, J. P.** (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins, *Adv Protein Chem* **42**: 1-76.
- Gogos, A., Gorman, J., and Shapiro, L.** (2004) Structure of *Escherichia coli* YfdW, a type

- III CoA transferase, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 507-511.
- Goodno, C. C.** (1979) Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 2620-2624.
- Grabowski, R., and Buckel, W.** (1991) Purification and properties of an iron-sulfur-containing and pyridoxal-phosphate-independent L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Eur J Biochem* **199**: 89-94.
- Graceffa, P., and Dominguez, R.** (2003) Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics, *J Biol Chem* **278**: 34172-34180.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Valencia, C., Campanacci, V., and Cambillau, C.** (2003) The crystal structure of the *Escherichia coli* YfdW gene product reveals a new fold of two interlaced rings identifying a wide family of CoA transferases, *J Biol Chem* **278**: 34582-34586.
- Hans, M., Sievers, J., Müller, U., Bill, E., Vorholt, J. A., Linder, D., and Buckel, W.** (1999) 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum*, *Eur J Biochem* **265**: 404-414.
- Hans, M., Buckel, W., and Bill, E.** (2000) The iron-sulfur clusters in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. Biochemical and spectroscopic investigations, *Eur J Biochem* **267**: 7082-7093.
- Hans, M., Bill, E., Cirpus, I., Pierik, A. J., Hetzel, M., Alber, D., and Buckel, W.** (2002) Adenosine triphosphate-induced electron transfer in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*, *Biochemistry* **41**: 5873-5882.
- Hans, M., Buckel, W., and Bill, E.** (2008) Spectroscopic evidence for an all-ferrous [4Fe-4S]0 cluster in the superreduced activator of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*, *J Biol Inorg Chem* **13**: 563-574.
- Harrison, C. J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., and Kuriyan, J.** (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK, *Science* **276**: 431-435.
- Härtel, U., and Buckel, W.** (1996) Sodium ion-dependent hydrogen production in *Acidaminococcus fermentans*, *Arch Microbiol* **166**: 350-356.
- Heider, J.** (2001) A new family of CoA-transferases, *FEBS Lett* **509**: 345-349.
- Herrmann, G., Jayamani, E., Mai, G., and Buckel, W.** (2008) Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria, *J Bacteriol* **190**: 784-791.
- Ho, B. K., and Gruswitz, F.** (2008) HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures, *BMC Struct Biol* **8**: 49.
- Hofmeister, A. E., and Buckel, W.** (1992) (R)-lactyl-CoA dehydratase from *Clostridium propionicum*. Stereochemistry of the dehydration of (R)-2-hydroxybutyryl-CoA to

- crotonyl-CoA, *Eur J Biochem* **206**: 547-552.
- Hofmeister, A. E., Grabowski, R., Linder, D., and Buckel, W.** (1993) L-serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups, *Eur J Biochem* **215**: 341-349.
- Hofmeister, A. E., Albracht, S. P., and Buckel, W.** (1994) Iron-sulfur cluster-containing L-serine dehydratase from *Peptostreptococcus asaccharolyticus*: correlation of the cluster type with enzymatic activity, *FEBS Lett* **351**: 416-418.
- Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P., and Schenkel, A.** (2008) Searching protein structure databases with DaliLite v.3, *Bioinformatics* **24**: 2780-2781.
- Hong, B. S., Yun, M. K., Zhang, Y. M., Chohnan, S., Rock, C. O., White, S. W., Jackowski, S., Park, H. W., and Leonardi, R.** (2006) Prokaryotic type II and type III pantothenate kinases: The same monomer fold creates dimers with distinct catalytic properties, *Structure* **14**: 1251-1261.
- Howard, J. B., and Rees, D. C.** (1994) Nitrogenase: a nucleotide-dependent molecular switch, *Annu Rev Biochem* **63**: 235-264.
- Huang, S. P., Tsai, M. Y., Tzou, Y. M., Wu, W. G., and Wang, C.** (1993) Aspartyl residue 10 is essential for ATPase activity of rat hsc70, *J Biol Chem* **268**: 2063-2068.
- Hurley, J. H., Faber, H. R., Worthylake, D., Meadow, N. D., Roseman, S., Pettigrew, D. W., and Remington, S. J.** (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* IIIGlc with glycerol kinase, *Science* **259**: 673-677.
- Hurley, J. H.** (1996) The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **25**: 137-162.
- Igarashi, R. Y., and Seefeldt, L. C.** (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**: 351-384.
- Itoh, T., Matsuda, H., and Mori, H.** (1999) Phylogenetic analysis of the third hsp70 homolog in *Escherichia coli*; a novel member of the Hsc66 subfamily and its possible co-chaperone, *DNA Res* **6**: 299-305.
- Jackins, H. C., and Barker, H. A.** (1951) Fermentative processes of the fusiform bacteria, *J Bacteriol* **61**: 101-114.
- Jacob, U., Mack, M., Clausen, T., Huber, R., Buckel, W., and Messerschmidt, A.** (1997) Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases, *Structure* **5**: 415-426.
- Jang, S. B., Seefeldt, L. C., and Peters, J. W.** (2000) Insights into nucleotide signal transduction in nitrogenase: structure of an iron protein with MgADP bound, *Biochemistry* **39**: 14745-14752.
- Jeoung, J. H., and Dobbek, H.** (2007) Carbon dioxide activation at the Ni,Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase, *Science* **318**: 1461-1464.

- Jonsson, S., Ricagno, S., Lindqvist, Y., and Richards, N. G.** (2004) Kinetic and mechanistic characterization of the formyl-CoA transferase from *Oxalobacter formigenes*, *J Biol Chem* **279**: 36003-36012.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C.** (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex, *Nature* **347**: 37-44.
- Kabsch, W.** (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *J Appl Cryst* **26**: 795-800.
- Kabsch, W., and Holmes, K. C.** (1995) The actin fold, *FASEB J* **9**: 167-174.
- Kennedy, M. C., Stout, C. D., and Richard, C.** (1992) Aconitase: An Iron-Sulfur Enzyme, in *Advances in Inorganic Chemistry* (323-339, Academic Press,
- Kim, J., Woo, D., and Rees, D. C.** (1993) X-ray crystal structure of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Clostridium pasteurianum* at 3.0-Å resolution, *Biochemistry* **32**: 7104-7115.
- Kim, J., Hetzel, M., Boiangiu, C. D., and Buckel, W.** (2004) Dehydration of (*R*)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of α -amino acids by anaerobic bacteria, *FEMS Microbiol Rev* **28**: 455-468.
- Kim, J., Darley, D., and Buckel, W.** (2005) 2-Hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase and its activator from *Clostridium difficile*, *FEBS J* **272**: 550-561.
- Kim, J., Darley, D., Selmer, T., and Buckel, W.** (2006) Characterization of (*R*)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase and a family III coenzyme A transferase involved in reduction of L-leucine to isocaproate by *Clostridium difficile*, *Appl Environ Microbiol* **72**: 6062-6069.
- Kim, J., Lu, Y., and Buckel, W.** (2007) ATP- and redox-induced conformational changes in the activator of the radical enzyme 2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase, *Comptes Rendus Chimie* **10**: 742-747.
- Kim, J., Darley, D. J., Buckel, W., and Pierik, A. J.** (2008) An allylic ketyl radical intermediate in clostridial amino-acid fermentation, *Nature* **452**: 239-242.
- Kim, J., Pierik, A. J., and Buckel, W.** (2010) A complex of 2-hydroxyisocaproyl-coenzyme A dehydratase and its activator from *Clostridium difficile* stabilized by aluminium tetrafluoride-adenosine diphosphate, *Chemphyschem* **11**: 1307-1312.
- Klees, A. G., Linder, D., and Buckel, W.** (1992) 2-Hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*): an iron-sulfur flavoprotein, *Arch Microbiol* **158**: 294-301.
- Kleywegt, G. J., and Jones, T. A.** (1997) Detecting folding motifs and similarities in protein structures, *Methods Enzymol* **277**: 525-545.
- Knappe, J., and Wagner, A. F.** (2001) Stable glycyl radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase (III), *Adv Protein Chem* **58**: 277-315.

- Knauer, S. H., Buckel, W., and Dobbek, H.** (2011) Structural Basis for Reductive Radical Formation and Electron Recycling in (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA Dehydratase, *Journal of the American Chemical Society* **133**: 4342-4347.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K.** (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J Mol Graph* **14**: 51-55, 29-32.
- Krissinel, E., and Henrick, K.** (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J Mol Biol* **372**: 774-797.
- Kuchta, R. D., and Abeles, R. H.** (1985) Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase, *J Biol Chem* **260**: 13181-13189.
- Kuchta, R. D., Hanson, G. R., Holmquist, B., and Abeles, R. H.** (1986) Fe-S centers in lactyl-CoA dehydratase, *Biochemistry* **25**: 7301-7307.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685.
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Stout, C. D.** (1992) Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound, *Biochemistry* **31**: 2735-2748.
- Lauble, H., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Stout, C. D.** (1994) Crystal structures of aconitase with trans-aconitate and nitrocitrate bound, *J Mol Biol* **237**: 437-451.
- Lees, N. S., Chen, D., Walsby, C. J., Behshad, E., Frey, P. A., and Hoffman, B. M.** (2006) How an enzyme tames reactive intermediates: positioning of the active-site components of lysine 2,3-aminomutase during enzymatic turnover as determined by ENDOR spectroscopy, *J Am Chem Soc* **128**: 10145-10154.
- Leslie, A. G. W.** (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data.
- Leutwein, C., and Heider, J.** (2001) Succinyl-CoA:(*R*)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria, *J Bacteriol* **183**: 4288-4295.
- Leys, D., Basran, J., Talfournier, F., Sutcliffe, M. J., and Scrutton, N. S.** (2003) Extensive conformational sampling in a ternary electron transfer complex, *Nat Struct Biol* **10**: 219-225.
- Licht, S., Gerfen, G. J., and Stubbe, J.** (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases, *Science* **271**: 477-481.
- Lippard, S. J., and Berg, J. M.** (1995) *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Locher, K. P., Hans, M., Yeh, A. P., Schmid, B., Buckel, W., and Rees, D. C.** (2001) Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A, *J Mol Biol* **307**: 297-308.

- Ma, B., Kumar, S., Tsai, C. J., and Nussinov, R.** (1999) Folding funnels and binding mechanisms, *Protein Eng* **12**: 713-720.
- Mack, M., and Buckel, W.** (1995) Identification of glutamate beta 54 as the covalent-catalytic residue in the active site of glutamate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*, *FEBS Lett* **357**: 145-148.
- Majeed, S., Ofek, G., Belachew, A., Huang, C., Zhou, T., and Kwong, P.** (2003) Enhancing Protein Crystallization through Precipitant Synergy, *Structure* **11**:1061-1070
- Marcus, R. A., and Sutin, N.** (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biochimica et Biophysica Acta* **811**: 265-322.
- Martins, B. M., Dobbek, H., Cinkaya, I., Buckel, W., and Messerschmidt, A.** (2004) Crystal structure of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase: radical catalysis involving a [4Fe-4S] cluster and flavin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15645-15649.
- Massey, V., Stankovich, M., and Hemmerich, P.** (1978) Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts, *Biochemistry* **17**: 1-8.
- Mayhew, S. G.** (1978) The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase, *Eur J Biochem* **85**: 535-547.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J.** (2007) Phaser crystallographic software, *J Appl Crystallogr* **40**: 658-674.
- Michaelis, L.** (1939) FREE RADICALS AS INTERMEDIATE STEPS OF OXIDATION-REDUCTION, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **7**: 33-49.
- Miyashita, O., Onuchic, J. N., and Okamura, M. Y.** (2004) Transition state and encounter complex for fast association of cytochrome c2 with bacterial reaction center, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16174-16179.
- Müller, U., and Buckel, W.** (1995) Activation of (*R*)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*, *Eur J Biochem* **230**: 698-704.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J.** (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**: 240-255.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. J., and Deerfield, D. W. I.** (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation.
- Nicolet, Y., Amara, P., Mouesca, J. M., and Fontecilla-Camps, J. C.** (2009) Unexpected electron transfer mechanism upon AdoMet cleavage in radical SAM proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14867-14871.
- Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H., and Wakagi, T.** (2007) Crystal structures of an ATP-dependent hexokinase with broad substrate specificity from the

- hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*, *J Biol Chem* **282**: 9923-9931.
- O'Brien, M. C., and McKay, D. B.** (1993) Threonine 204 of the chaperone protein Hsc70 influences the structure of the active site, but is not essential for ATP hydrolysis, *J Biol Chem* **268**: 24323-24329.
- O'Brien, M. C., Flaherty, K. M., and McKay, D. B.** (1996) Lysine 71 of the chaperone protein Hsc70 Is essential for ATP hydrolysis, *J Biol Chem* **271**: 15874-15878.
- Otterbein, L. R., Graceffa, P., and Dominguez, R.** (2001) The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state, *Science* **293**: 708-711.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L.** (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature* **402**: 47-52.
- Page, C. C., Moser, C. C., and Dutton, P. L.** (2003) Mechanism for electron transfer within and between proteins, *Curr Opin Chem Biol* **7**: 551-556.
- Parales, R. E., and Harwood, C. S.** (1992) Characterization of the genes encoding beta-ketoacidate: succinyl-coenzyme A transferase in *Pseudomonas putida*, *J Bacteriol* **174**: 4657-4666.
- Parthasarathy, A., Buckel, W., and Smith, D. M.** (2010) On the thermodynamic equilibrium between (*R*)-2-hydroxyacyl-CoA and 2-enoyl-CoA, *FEBS J* **277**: 1738-1746.
- Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S.** (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement, *Nat Struct Biol* **6**: 458-463.
- Pitsch, C., and Simon, H.** (1982) The stereochemical course of the water elimination from (2*R*)-phenyllactate in the amino acid fermentation of *Clostridium sporogenes*, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **363**: 1253-1257.
- Rebek, J.** (1990) Molecular Recognition with Model Systems, *Angewandte Chemie International Edition in English* **29**: 245-255.
- Rees, D. C., and Howard, J. B.** (2000) Nitrogenase: standing at the crossroads, *Curr Opin Chem Biol* **4**: 559-566.
- Rees, D. C.** (2002) Great metallocusters in enzymology, *Annu Rev Biochem* **71**: 221-246.
- Reichard, P.** (1995) To be there when the picture is painted, *Annu Rev Biochem* **64**: 1-28.
- Reineke, J., Tenzer, S., Rupnik, M., Koschinski, A., Hasselmayer, O., Schrattenholz, A., Schild, H., and von Eichel-Streiber, C.** (2007) Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B, *Nature* **446**: 415-419.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H., Jr., Bork, P., and Sander, C.** (1993) Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily, *Trends Biochem Sci* **18**: 247-248.
- Ricagno, S., Jonsson, S., Richards, N., and Lindqvist, Y.** (2003) Formyl-CoA transferase

- encloses the CoA binding site at the interface of an interlocked dimer, *EMBO J* **22**: 3210-3219.
- Robbins, A. H., and Stout, C. D.** (1989) Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal, *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 3639-3643.
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D.** (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex, *Science* **294**: 1679-1684.
- Rould, M. A., Wan, Q., Joel, P. B., Lowey, S., and Trybus, K. M.** (2006) Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states, *J Biol Chem* **281**: 31909-31919.
- Sanchez, M., Valencia, A., Ferrandiz, M. J., Sander, C., and Vicente, M.** (1994) Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family, *EMBO J* **13**: 4919-4925.
- Schafer, D. A., and Schroer, T. A.** (1999) Actin-related proteins, *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 341-363.
- Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B., and Rees, D. C.** (1997) Structure of ADP*AlF₄⁻-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction, *Nature* **387**: 370-376.
- Schrodinger, LLC.** (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2.
- Schroer, T. A., Fyrberg, E., Cooper, J. A., Waterston, R. H., Helfman, D., Pollard, T. D., and Meyer, D. I.** (1994) Actin-related protein nomenclature and classification, *J Cell Biol* **127**: 1777-1778.
- Schüler, H.** (2001) ATPase activity and conformational changes in the regulation of actin, *Biochim Biophys Acta* **1549**: 137-147.
- Schweiger, G., and Buckel, W.** (1984) On the dehydration of (*R*)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*, *FEBS Lett* **171**: 79-84.
- Schweiger, G., and Buckel, W.** (1985) Identification of acrylate, the product of the dehydration of (*R*)-lactate catalysed by cell-free extracts from *Clostridium propionicum*, *FEBS Lett* **185**: 253-256.
- Schweiger, G., Dutsch, R., and Buckel, W.** (1987) Purification of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. An iron-sulfur protein, *Eur J Biochem* **169**: 441-448.
- Sebahia, M., and Thomson, N. R.** (2006) Colonic irritation, *Nat Rev Microbiol* **4**: 882-883.
- Sebahia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N. R., Roberts, A. P., Cerdano-Tarraga, A. M., Wang, H., Holden, M. T., Wright, A., Churcher, C., Quail, M. A., Baker, S., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P., Dowd, L., Fraser, A., Feltwell, T., Hance,**

- Z., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Price, C., Rabbinowitsch, E., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Unwin, L., Whithead, S., Dupuy, B., Dougan, G., Barrell, B., and Parkhill, J.** (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome, *Nat Genet* **38**: 779-786.
- Seebach, D.** (1979) Methods of Reactivity Umpolung, *Angewandte Chemie International Edition in English* **18**: 239-258.
- Selmer, T., and Buckel, W.** (1999) Oxygen exchange between acetate and the catalytic glutamate residue in glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. Implications for the mechanism of CoA-ester hydrolysis, *J Biol Chem* **274**: 20772-20778.
- Selmer, T., and Andrei, P. I.** (2001) *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of *p*-cresol, *Eur J Biochem* **268**: 1363-1372.
- Sheldrick, G. M.** (2008) A short history of SHELX, *Acta Crystallogr A* **64**: 112-122.
- Sidhu, H., Ogden, S. D., Lung, H. Y., Luttge, B. G., Baetz, A. L., and Peck, A. B.** (1997) DNA sequencing and expression of the formyl coenzyme A transferase gene, *frc*, from *Oxalobacter formigenes*, *J Bacteriol* **179**: 3378-3381.
- Simpson, F. B., and Burris, R. H.** (1984) A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase, *Science* **224**: 1095-1097.
- Smith, D. M., Buckel, W., and Zipse, H.** (2003) Deprotonation of enoxy radicals: theoretical validation of a 50-year-old mechanistic proposal, *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 1867-1870.
- Snell, E. E., Di Mari, S. J., and Paul, D. B.** (1970) 7 Schiff Base Intermediates in Enzyme Catalysis, in *The Enzymes* (335-370, Academic Press,
- Sprang, S. R.** (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis, *Annu Rev Biochem* **66**: 639-678.
- Sprang, S. R.** (2000) Conformational display: a role for switch polymorphism in the superfamily of regulatory GTPases, *Sci STKE* **2000**: pe1.
- Sramek, S. J., and Frerman, F. E.** (1975) Purification and properties of *Escherichia coli* coenzyme A-transferase, *Arch Biochem Biophys* **171**: 14-26.
- Stenmark, P., Gurmu, D., and Nordlund, P.** (2004) Crystal structure of CaiB, a type-III CoA transferase in carnitine metabolism, *Biochemistry* **43**: 13996-14003.
- Stickland, L. H.** (1934) Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy, *Biochem J* **28**: 1746-1759.
- Stubbe, J., and van Der Donk, W. A.** (1998) Protein Radicals in Enzyme Catalysis, *Chem Rev* **98**: 705-762.

- Stubbe, J. A.** (1989) Protein radical involvement in biological catalysis?, *Annu Rev Biochem* **58**: 257-285.
- Switzer, R. L.** (1989) Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes, *Biofactors* **2**: 77-86.
- Tarkka, T., Raatikainen, E., Friman, S., and Oikarinen, J.** (1995) The ATP/ADP binding domains of actin are conserved in nucleosome complexed with histone H1 and high mobility group-17 protein, *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 509-514.
- Terwilliger, T. C.** (2003) Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 38-44.
- Tezcan, F. A., Kaiser, J. T., Mustafi, D., Walton, M. Y., Howard, J. B., and Rees, D. C.** (2005) Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein, *Science* **309**: 1377-1380.
- Thamer, W., Cirpus, I., Hans, M., Pierik, A. J., Selmer, T., Bill, E., Linder, D., and Buckel, W.** (2003) A two [4Fe-4S]-cluster-containing ferredoxin as an alternative electron donor for 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*, *Arch Microbiol* **179**: 197-204.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K.** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria, *Bacteriol Rev* **41**: 100-180.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acid Res.* **22**: 4673-4680.
- van Amsterdam, I. M., Ubbink, M., Einsle, O., Messerschmidt, A., Merli, A., Cavazzini, D., Rossi, G. L., and Canters, G. W.** (2002) Dramatic modulation of electron transfer in protein complexes by crosslinking, *Nat Struct Biol* **9**: 48-52.
- van den Ent, F., and Lowe, J.** (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*, *EMBO J* **19**: 5300-5307.
- van den Ent, F., Amos, L. A., and Lowe, J.** (2001) Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton, *Nature* **413**: 39-44.
- Vorobiev, S., Strokopytov, B., Drubin, D. G., Frieden, C., Ono, S., Condeelis, J., Rubenstein, P. A., and Almo, S. C.** (2003) The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5760-5765.
- Werst, M. M., Kennedy, M. C., Beinert, H., and Hoffman, B. M.** (1990) ^{17}O , ^1H , and ^2H electron nuclear double resonance characterization of solvent, substrate, and inhibitor binding to the $[4\text{Fe-4S}]^+$ cluster of aconitase, *Biochemistry* **29**: 10526-10532.
- White, H., and Jencks, W. P.** (1976) Properties of succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase, *J Biol Chem* **251**: 1708-1711.

- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., and Papoutsakis, E. T.** (1989) Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids, *Appl Environ Microbiol* **55**: 323-329.
- Wilbanks, S. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B.** (1994) Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. I. Kinetic analyses of active site mutants, *J Biol Chem* **269**: 12893-12898.
- Wilbanks, S. M., Chen, L., Tsuruta, H., Hodgson, K. O., and McKay, D. B.** (1995) Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments, *Biochemistry* **34**: 12095-12106.
- Wilbanks, S. M., and McKay, D. B.** (1995) How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site, *J Biol Chem* **270**: 2251-2257.
- Yount, R. G., Babcock, D., Ballantyne, W., and Ojala, D.** (1971) Adenylyl imidodiphosphate, an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage, *Biochemistry* **10**: 2484-2489.
- Zinecker, H., Andreesen, J. R., and Pich, A.** (1998) Partial purification of an iron-dependent L-serine dehydratase from *Clostridium sticklandii*, *J Basic Microbiol* **38**: 147-155.

8 Publikationen

Knauer, S.H., Buckel, W., and Dobbek, H. (2011) Structural Basis for Reductive Radical Formation and Electron Recycling in (*R*)-2-Hydroxyisocaproyl-CoA Dehydratase. *J Am Chem Soc* **133**:4342-4347.

9 Anhang

9.1 Chemikalien, Biochemikalien und Materialien

9.1.1 Chemikalien

ABCR GmbH:	(<i>R</i>)-2-Hydroxyisocaproat
Acros Organics:	Acetonitril, AlF_3 , Methylviologen, 99 % (v/v) MPD, Thioninacetat
Aldrich:	1,1'-Carbonyldiimidazol, Kaliumhexacyanoferrat, NH_4 -Acetat, TFA
BioRad:	Bradford-Reagens
Fermentas:	Molekulargewichtsmarker #SM0431
Fluka:	APS, ATP, Bis-Tris, (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-(-)-Butan-2,3-diol, Coomassie Brilliant Blau G250, Essigsäure, Li_2S , NaF, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Natriumoxalat, PEG 400, PEG 3.350, PEG 8.000, Triton X-100
Grüssing:	Ammoniumsulfat, NaCl
Hampton Research:	Index Screen, Crystal Screen 2, PEG 3.350, 50 % (w/v) PEG 3.350, PEG/Ion-Screen 2, SaltRx-Screen,
IBA GmbH:	Anhydrotetracyclin, D-Desthiobiotin
Jena Biosciences:	Wizard I-Screen, Wizard II-Screen
Merck:	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaOH, Natriumdithionit
Molecular Dimensions:	Structure Screen 1 und 2, PACT premier-Screen, JCSG- <i>plus</i> -Screen, ProPlex-Screen, Morpheus-Screen, MacroSol-Screen
OttoNordWald:	Bacto TM -Agar, Bacto TM -Hefeextrakt
Riedel-de Haën:	Bromphenolblau, HCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl
Roth:	α -D(+)-Glucose Monohydrat, Ampicillin, DTT, EDTA, 99 % (v/v) Glycerin, Glycin, Methanol, MOPS, NaHCO_3 , Roti®-Standard, SDS, TEMED, Tetrahydrofuran, Tris, Trypton/Pepton
Rießner Gase:	N_2 (99,999 %), N_2/H_2 (95 %/5 %)
Serva:	Acrylamid/Bisacrylamid, Carbenicillin, Chloramphenicol, DMF, Lactat-Dehydrogenase
Sigma:	ADP, ADPNP, CoA(Trilithiumsalz), Eisen(III)ammoniumcitrat, Na_3VO_4

Universität Bayreuth,

AG Prof. Dr. Dobbek: Precipitant Synergy Screen (hergestellt nach (Majeed *et al.*, 2003))

Universität Konstanz,

AG Prof. Dr. Kroneck: 5-Deaza-10-methyl-3-sulfopropylisoalloxazin (Kaliumsalz)

Wacker: Silicon-Antischaum-Emulsion Silfoam SE2

9.1.2 Enzyme und Proteine

BioRad: BSA

Fermentas: DNase I

Fluka: Aldolase, Lysozym

GE Healthcare: Carboanhydrase, Conalbumin, Ovalbumin, Ribonuklease A

Serva: Catalase

9.1.3 Materialien

Greiner Bio-one: Suspensionskultur Multiwellplatte (24 Well), 96 Well CrystalQuick-Platte

GE Healthcare: DEAE-SepharoseTM Fast Flow, HiLoadTM 16/60 Superdex 200 pg, Phenyl-SepharoseTM 6 Fast Flow, SourceTM 30Q, Sephadex G25

IBA GmbH: Strep-Tactin-Superflow

Millipore: Microcon-Zentrifugations-Filtereinheit (Molekulargewichtsgrenze 100 kDa)

Molecular Dimensions: MRC-Kristallisationsplatte

Viva Science: Viva Cell 70 (Molekulargewichtsgrenze 50 kDa), Viva Spin 500 (Molekulargewichtsgrenze 10 kDa und 30 kDa)

Waters Corporation: SepPak C₁₈-Säulen

9.2 Geräteliste

Agilent: 8453-Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer

Analytic Jena: SPECORD 30 Spektralphotometer, SPECORD 40 Spektralphotometer

Bender & Hobein AG: Vortex Genie

Branson: Sonifier Cell Disruptor B15

Bruker AXS:	Röntgenstrahlgenerator Nonius FR591
Coy Laboratory:	Handschuhkasten
Douglas Instruments Ltd.:	OryxNano
Eigene Anfertigung:	Apparatur für SDS-PAGE, Gelgießapparatur für SDS-Polyacrylamidgele
Eppendorf:	Zentrifuge 5810R, Zentrifuge MiniSpin
GE Healthcare:	ÄKTA prime, Electrophoresis Power Supply EPS301 und EPS601
Haake:	Wasserbad C25
Hartenstein:	Thermo Shaker TS-100,
Ikamag:	Magnetrührer Ikamag Reo
Julabo:	Wasserbad mit Schüttler SW21 und SW22
Kern & Sohn GmbH:	Waage 440-47N
Kontron:	Ultrazentrifuge
Marresearch GmbH:	Diffraktometer mit Mikrofokusröntgenröhre (mar μ X), <i>image plate</i> -Detektor mar345dtb
Melag Medizintechnik:	Autoklav Melag 23
PEQLAB:	Nanodrop-UV/Vis-Spektrometer
Rainin:	Pipetten
Sartorius AG:	Waage BL150S, Waage A210P
Sorvall:	Kühlzentrifuge RC6B Plus
VWR:	Heizblock
WTW:	pH-Meter inoLab pH Level 1

9.3 Weitere Tabellen

Tabelle 9-1: Kristallisation der Komplexansätze. Aufgeführt sind die Bedingungen unter denen Kristalle gewachsen sind. Hierbei ist jeweils der Screen und die entsprechende Nummer im Screen aufgelistet. Die Spalte „Nukleotid“ gibt an, welches Nukleotid zur Komplexbildung verwendet wurde. Wurde ADPNP im Ansatz verwendet, so wurde der Ansatz gereinigt. Waren $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$ oder $\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$ anwesend, so wurde der Ansatz nach der Inkubation nur konzentriert (vgl. Abschnitt 3.12.1). Der Kristall, von dem ein vollständiger Datensatz aufgenommen wurde, ist grau hinterlegt.

Kristallnummer	Nukleotid	Kristallisationsbedingung
01	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Morpheus-Screen, 36
02	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 9
03	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 21
04	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 28
05	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 29
06	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 40
07	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 1, 46
08	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Wizard-Screen 2, 39
09	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	SaltRx-Screen, 20
10	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	PEG/Ion-Screen 2, 35
11	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	ProPlex-Screen, 58
12	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Precipitant Synergy-Screen, 11
13	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Precipitant Synergy-Screen, 26
14	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Precipitant Synergy-Screen, 35
15	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	JCSG <i>plus</i> -Screen, 63
16	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	PACT premier-Screen, 81
17	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	PACT premier-Screen, 88
18	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	PACT premier-Screen, 92
19	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	PACT premier-Screen, 93
20	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Index-Screen, 60
21	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Index-Screen, 63
22	$\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4^-$	Index-Screen, 69
23	$\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$	Wizard-Screen 1, 26
24	$\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$	MacroSol-Screen, 22
25	$\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$	ProPlex-Screen, 32
26	$\text{ADP} \cdot \text{VO}_4^{3-}$	ProPlex-Screen, 48

27	ADP*VO ₄ ³⁻	Structure-Screen 1, 48
28	ADPNP	ProPlex-Screen, 10
29	ADPNP	ProPlex-Screen, 29
30	ADPNP	ProPlex-Screen, 39
31	ADPNP	ProPlex-Screen, 40
32	ADPNP	ProPlex-Screen, 46
33	ADPNP	ProPlex-Screen, 47
34	ADPNP	ProPlex-Screen, 48
35	ADPNP	ProPlex-Screen, 56
36	ADPNP	ProPlex-Screen, 62
37	ADPNP	ProPlex-Screen, 66
38	ADPNP	JCSG <i>plus</i> -Screen, 16
39	ADPNP	JCSG <i>plus</i> -Screen, 24
40	ADPNP	JCSG <i>plus</i> -Screen, 80
41	ADPNP	Wizard-Screen 1, 1
42	ADPNP	Wizard-Screen 1, 21
43	ADPNP	Wizard-Screen 1, 26
44	ADPNP	Wizard-Screen 1, 29
45	ADPNP	Structure-Screen 1, 36
46	ADPNP	Structure-Screen 2, 12
47	ADPNP	Index-Screen, 19
48	ADPNP	Index-Screen, 56
49	ADPNP	Index-Screen, 66
50	ADPNP	Index-Screen, 92
51	ADPNP	Index-Screen, 94
52	ADPNP	Precipitant Synergy-Screen, 20
53	ADPNP	Precipitant Synergy-Screen, 25
54	ADPNP	Crystal-Screen 2, 3
55	ADPNP	Crystal-Screen 2, 48
56	ADPNP	Morpheus-Screen, 6
57	ADPNP	Morpheus-Screen, 11
58	ADPNP	Morpheus-Screen, 33
59	ADPNP	Morpheus-Screen, 42
60	ADPNP	Morpheus-Screen, 43

61	ADPNP	Morpheus-Screen, 46
62	ADPNP	Morpheus-Screen, 68
63	ADPNP	Morpheus-Screen, 70
64	ADPNP	Morpheus-Screen, 82
65	ADPNP	Morpheus-Screen, 83
66	ADPNP	PACT premier-Screen, 48
67	ADPNP	PACT premier-Screen, 59
68	ADPNP	PACT premier-Screen, 60
69	ADPNP	PACT premier-Screen, 68
70	ADPNP	PACT premier-Screen, 80
71	ADPNP	PACT premier-Screen, 81
72	ADPNP	PACT premier-Screen, 83
73	ADPNP	PACT premier-Screen, 84
74	ADPNP	PACT premier-Screen, 92
75	ADPNP	PACT premier-Screen, 93
76	ADPNP	PACT premier-Screen, 95
77	ADPNP	PACT premier-Screen, 96

10 Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Holger Dobbek für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine freundliche Unterstützung, die guten Arbeitsbedingungen, für seinen ansteckenden Enthusiasmus sowie für viele ausführliche Diskussionen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Buckel für zahlreiche Diskussionen über die Dehydratasen und ihren Mechanismus sowie für die Bereitstellung der verwendeten Plasmide. Ebenso danke ich Dr. Jihoe Kim für die Einführung in das experimentelle Arbeiten mit den Dehydratase-Systemen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Laborkolleginnen und -kollegen Dr. Berta Martins, Brinda Selvaraj, Claudia Haas, Dr. Jae-Hun Jeoung, Jochen Fessler, Marlene Grünwald, Dr. Martin Bommer, Dr. Olivia Spiegelhauer, Sandra Hennig, Sebastian Götzl, Silke Steinborn, Simon Fillenberg, Sophia Mende, Dr. Tobias Werther und Tzong-Yuan Lin für die großartige Atmosphäre und den Spaß im Labor, die hilfreichen Diskussionen und nicht zu vergessen die lustigen Kubb-Spiele. Darüber hinaus danke ich insbesondere Dr. Jae-Hun Jeoung für die Einweisung in die Welt des anoxischen Arbeitens und seine wertvollen Ratschläge. Weiterhin danke ich Christina Diederich und Philip Weyrauch für ihre Mitarbeit im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Olivia Spiegelhauer für das stets produktive, gemeinsame Arbeiten, die humorvollen Unterhaltungen und vor allem ihre Freundschaft.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Paul Rösch für die Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Birgitta Wöhrle, Dr. Olivia Spiegelhauer und meinem Vater für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht nicht zuletzt an meine Eltern für ihre stetige Unterstützung in jeder Hinsicht und ihre immerwährende Liebe.

Schließlich geht mein tiefster Dank an meine geliebte Frau Christine. Ich danke Dir für Deine Geduld, Deine Unterstützung und Deinen Glauben an mich. Du bist das Glück und der Sonnenschein in meinem Leben und Quelle meiner Kraft.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'S. P. B.' followed by a flourish.

Bayreuth, den 03. Februar 2012

